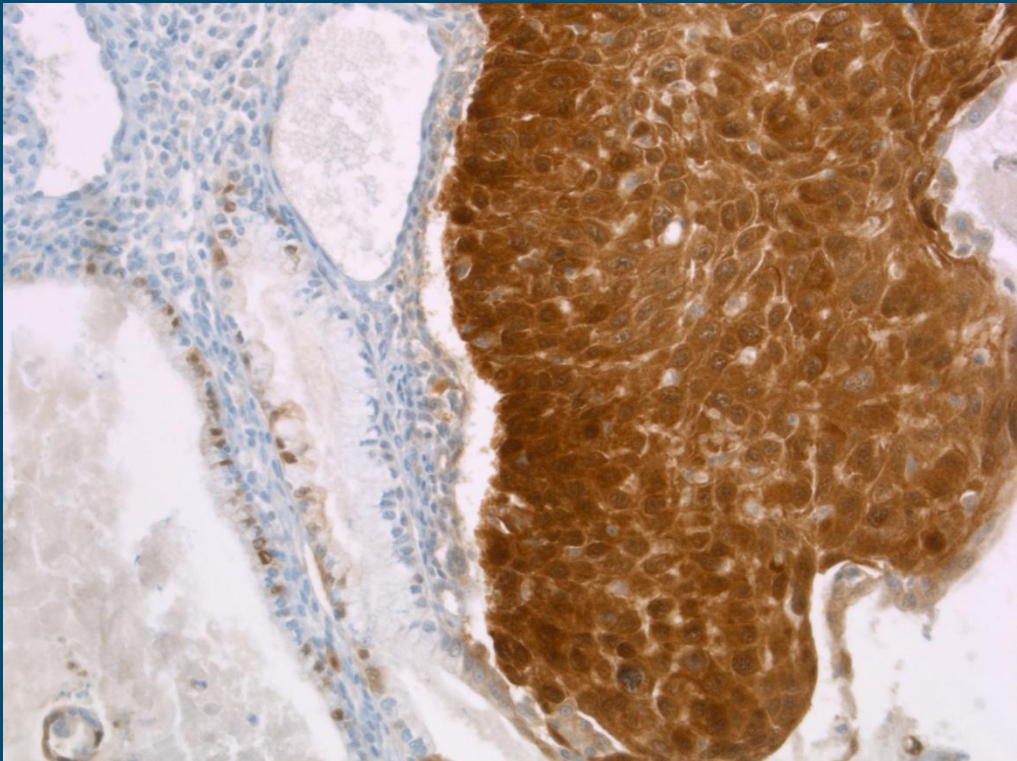


# **PERFILES MOLECULARES DE RESPUESTA EN CÁNCER DE CÉRVIX LOCALMENTE AVANZADO TRATADO CON RADIOTERAPIA RADICAL**



Jesús Romero Fernández  
Madrid, Junio 2017



**Universidad Autónoma de Madrid**  
Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina



**PERFILES MOLECULARES DE RESPUESTA EN CÁNCER DE CÉRVIX  
LOCALMENTE AVANZADO TRATADO CON RADIOTERAPIA  
RADICAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

**JESÚS ROMERO FERNÁNDEZ**

DIRECTOR

**ALEJANDRO DE LA TORRE TOMAS**

TUTOR

**JUAN ANTONIO VARGAS**

Madrid, 2017

A mis hijos Jesús y Sofía

## AGRADECIMIENTOS

A Clara Salas por su amistad y apoyo incondicional, sin cuya ayuda no hubiera podido hacer esta tesis.

A Carmen Bellas por su ayuda en la realización de esta tesis.

A Angel Montero por ayudarme a recopilar datos y muestras de las pacientes.

A Ricardo Sánchez por su enseñanza y ayuda en el laboratorio.

A Alejandro de la Torre y el resto de compañeros del Servicio: Francisco Valcárcel, Rosa Magallón, Carlos Regueito, M<sup>a</sup> Isabel García Berrocal, Irma Zapata, Cristina de la Fuente y Joaquín Velasco.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1.1 <i>Cáncer de cérvix uterino</i> .....	7
1.1.1 Anatomía e histología .....	7
1.1.2 Epidemiología y etiología .....	7
1.1.3 Anatomía patológica .....	11
1.1.4 Clínica y estadificación .....	15
1.1.5 Patrón de crecimiento .....	18
1.1.6 Factores pronósticos clínico-patológicos .....	20
1.1.7 Tratamiento .....	24
1.1.8 Toxicidad .....	29
1.2 <i>Ensayos predictivos de respuesta</i> .....	32
1.2.1 Concepto .....	32
1.2.2 Radiosensibilidad intrínseca .....	34
1.2.3 Repoblación tumoral. Tiempo potencial de doblamiento .....	35
1.3 <i>Perfiles moleculares de respuesta</i> .....	37
1.3.1 Concepto y técnicas generales .....	37
1.3.2 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) .....	39
1.3.3 Antígeno ki67 .....	40
1.3.4 Proteína supresora de tumores p53 .....	40
1.3.5 Ciclo-oxigenasa-2 (COX2) .....	41
1.3.6 Gen supresor de tumores p16 .....	42
1.3.7 Oxigenación tumoral .....	43
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>47</b>
<b>3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....</b>	<b>48</b>
<b>4. PACIENTES Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
4.1 <i>Estudio clínico</i> .....	49
4.1.1 Inclusión de pacientes y recogida de datos .....	49
4.1.2 Características de los pacientes .....	51
4.1.3 Características del tratamiento .....	53
4.2 <i>Ensayos predictivos de respuesta</i> .....	58
4.2.1 Pacientes y características clínicas .....	58
4.2.2 Metodología de los ensayos predictivos .....	59
4.3 <i>Perfiles moleculares</i> .....	62
4.3.1 Pacientes y características clínicas .....	62
4.3.2 Inmunohistoquímica .....	63
4.4 <i>Estadística</i> .....	67
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
5.1 <i>Estudio clínico</i> .....	70
5.1.1 Supervivencia global y causa-específica .....	70
5.1.2 Control local y patrón de recidiva .....	70

5.1.3 Factores pronósticos clínico- terapéuticos .....	72
5.1.4 Toxicidad tardía .....	81
5.1.5 Análisis multivariante .....	86
5.2 <i>Ensayos predictivos de respuesta</i> .....	88
5.2.1 Determinación de la fracción superviviente a 2 Gy .....	88
5.2.2 Medición del tiempo potencial de doblamiento (Tpot).....	89
5.3 <i>Perfiles moleculares de respuesta</i> .....	90
5.3.1 Características del subgrupo de pacientes con perfil molecular .....	90
5.3.2 Frecuencias y correlación con parámetros clínicos .....	90
5.3.3 Recidiva pélvica, retroperitoneal y distancia en el subgrupo de pacientes con estudio molecular .....	93
5.3.4 Supervivencia global, causa-específica y libre de recidiva.....	95
5.3.5 Perfil molecular de riesgo .....	96
5.3.6 Oxigenación tumoral .....	97
5.3.7 Análisis multivariante del subgrupo con estudio molecular .....	98
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
6.1 <i>Estudio clínico</i> .....	101
6.1.1 Factores pronósticos clínicos .....	101
6.1.2 Toxicidad .....	109
6.2 <i>Ensayos predictivos de respuesta</i> .....	112
6.3 <i>Perfiles moleculares de respuesta</i> .....	113
6.4 <i>Limitaciones del estudio</i> .....	128
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>130</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>132</b>

## ABREVIATURAS

ACS: American Cancer Society  
AJCC: American Joint Committee on Cancer  
ASCP: American Society for Clinical Pathology  
ASCCP: American Society for Colposcopy and Cervical Pathology  
ASCH: atypical squamous cells cannot exclude HSIL  
ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance  
CDK: cyclin-dependent kinase  
CIN: cervical intraepithelial neoplasia  
CIS: carcinoma in situ  
COX2: ciclooxigenasa 2  
CTCAE: Common Toxicity Criteria for Adverse Effects  
DNA: desoxiribonucleic acid  
EGFR: epidermal growth factor receptor  
ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay  
FIG: French Italian Glossary  
FISH: fluorescence in situ hibridation  
FS2: fracción superviviente a 2 Gy  
HBSS: Hank's balanced salt solution  
HIF-1: hipoxia-inducible factor  
HSIL: high grade squamous intraepithelial lesions

HPV: Human papillomavirus  
HR: hazard ratio  
IARC: International Agency for Research on Cancer  
IMVD: intratumoral microvessels density  
LENT-SOMA: Late Effect Normal Tissues – Subjective, Objective, Management, Analytic  
LSIL: low grade intraepithelial lesions  
MAPK: mitogen-activated protein kinases  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
OR: odds ratio  
OTT: overall treatment time  
PCR: polimerase chain reaction  
PET: positron emission tomography  
pRb: proteína del retinoblastoma  
RMN: resonancia magnética nuclear  
RTOG: Radiation Therapy Oncology Group  
SIU: sonda intrauterina  
TAC: tomografía axial computerizada  
TGF : transforming growth factor  
UIV: urografía intravenosa  
VEGF: vascular endothelial growth factor

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer de cérvix uterino

### *1.1.1 Anatomía e histología*

El útero es un órgano muscular hueco que se compone de cuerpo y cuello uterinos, separados por una estrechez que se denomina istmo. El cuello uterino o cérvix tiene aproximadamente 3 cm. y presenta una porción intravaginal o exocérvix y otra supravaginal o endocérvix. La porción intravaginal protruye hacia la vagina y presenta en su superficie el orificio cervical externo con un labio anterior y otro posterior, el cual comunica con el interior del útero a través del canal endocervical. Alrededor del útero y del cérvix se encuentran los parametrios formados por tejido conectivo, vascular y el ligamento ancho que llega hasta la pared pçelvica.

La irrigación del útero se produce a partir de las arterias uterinas, procedente de la rama anterior de la arteria hipogástrica, que penetran por el parametrio y dan ramas hacia el cérvix, cuerpo uterino, trompa y ovarios.

Los linfáticos pélvicos siguen el mismo recorrido que los vasos y, generalmente, reciben el mismo nombre. Los linfáticos cervicales drenan en los ganglios ilíacos comunes, ilíacos externos, ilíacos internos hipogástricos y obturadores.

El exocérvix se encuentra recubierto por un epitelio plano estratificado que se continúa con el de la vagina. A partir del orificio cervical externo se produce una transición brusca, llamada unión escamo-columnar, a un epitelio cilíndrico simple que tapiza el endocérvix con presencia de glándulas productoras de moco.

### *1.1.2 Epidemiología y etiología*

En los últimos años se han desarrollado diversos proyectos internacionales para estudiar la incidencia y prevalencia de diversos tipos tumorales, así como la supervivencia de las pacientes con cáncer de cérvix. Entre ellos destacan el proyecto GLOBOCAN2012<sup>1</sup>, llevado a cabo por la Organización Mundial de la Salud y la



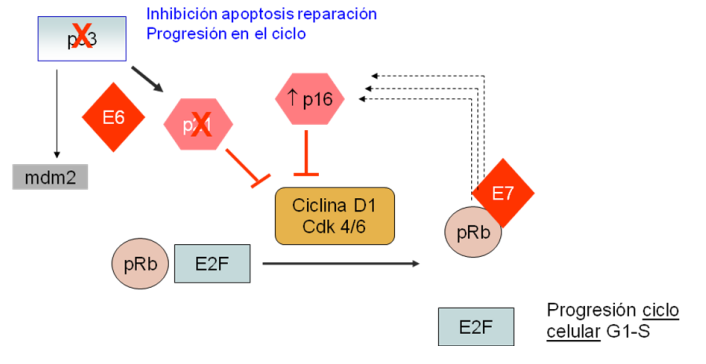
*Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC); y el EURO CARE, que analiza la incidencia y supervivencia del cáncer en Europa<sup>2</sup>.

Al presentar una estrecha relación con hábitos sexuales y acceso a recursos sanitarios, la incidencia del cáncer de cérvix muestra una amplia variabilidad entre diferentes países. A nivel mundial es el cuarto tumor más frecuente en mujeres con un 7.9% de los casos<sup>1</sup>. La tasa de incidencia mundial de cáncer de cérvix esta en torno a 13 casos por 100000, siendo más frecuente en países menos desarrollados como África oriental (42.7), Melanesia (33.3), y Sudáfrica (31.5); y presentando una menor incidencia en países desarrollados como Australia (4.4). En Europa es el sexto cáncer más frecuente en mujeres, con una tasa de incidencia ajustada a la población estándar de 11,3 x 100.000 (Ferlay2013b). La mortalidad también corre pareja con el nivel socio-económico existiendo diferencias de hasta 18 veces entre diferentes países. El 87% de las muertes por cáncer de cérvix ocurren en países en desarrollo. Las tasas de mortalidad oscilan entre menos del 2 x 100000 de Australia y Europa hasta más del 25 x 100000 de África<sup>1</sup>.

En España la incidencia de cáncer de cérvix es baja, situándose en duodécima posición en frecuencia en mujeres. Se ha estimado que en 2014 se diagnosticaron en España 2375 casos nuevos de cáncer de cérvix. La tasa de incidencia ajustadas a la población mundial en España fue del 7.7 x 100000, cifra inferior a la media europea<sup>3</sup>. También existen variaciones regionales dentro de España que van desde el 3.8 x 100000 en Navarra hasta el 8.5 x 100000 en Tarragona<sup>4</sup>. La supervivencia relativa a 5 años estandarizada por edad en el período 2000-2007 en España fue del 63.9% (EURO CARE-5), ligeramente superiores al 62.7% de la media europea<sup>2</sup>.

En cuanto a la etiología, se han objetivado consistentemente una serie de factores de riesgo relacionados con la actividad sexual como edad precoz de inicio de actividad sexual y número de parejas. Desde mediados de los 70 se sabe que el agente infeccioso responsable es el **virus del papiloma humano** (*human papillomavirus*, HPV), considerándose el cáncer de cérvix como una enfermedad de transmisión sexual. El HPV es un virus DNA de doble cadena circular con una cápsula icosaédrica y un

Figura 1: Mecanismo de carcinogénesis del HPV, a través de las proteínas virales E6 y E7, que inducen progresión en el ciclo celular.



genoma de 800 bp, que tiene una gran afinidad por las células del epitelio escamo-columnar cervical. Una vez integrado en el genoma de la célula huésped, produce varias proteínas multifuncionales siendo las más importantes la E6 y E7, las cuales producen la división celular incontrolada<sup>5</sup> (Figura 1).

La oncoproteína E6 se une a la proteína supresora de tumores p53, encargada de la detección y reparación del daño al DNA, formando un complejo E6-p53 que recluta los enzimas necesarios para la proteólisis<sup>6,7</sup>.

La oncoproteína E7 actúa mediante su unión a la proteína del retinoblastoma (pRb), cuya función es suprimir el crecimiento celular uniéndose a los factores de transcripción necesarios para la replicación del DNA. La unión de E7 a la pRb provoca su fosforilación y libera el factor E2F que estimula el crecimiento celular<sup>8</sup>. Además, la E7 inhibe la actividad de las proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclina p21 y p27.

Existen más de 80 tipos de HPV, con afinidad por distintas regiones del cuerpo. En cuanto a cáncer de cérvix, el HPV-16 y el HPV-18 son los más carcinogénicos y aparecen con la mayor frecuencia. Los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 son también considerados de alto riesgo mientras que los tipos 26, 53 y 66 se consideran probablemente carcinogénicos<sup>9</sup>. El HPV es un virus de contagio sexual y muy ubicuo. Se calcula que la mitad de los individuos contraerán la infección a lo largo de su vida y hasta el 80% de las mujeres de 50 años habrán estado infectadas en algún momento de sus vidas. Los factores de riesgo para la infección son actividad sexual,

edad y sexo, siendo el mayor grupo de riesgo las mujeres sexualmente activas y menores de 25 años, en las cuales la incidencia de infección por HPV a 2 años oscila entre el 38.9 - 82%<sup>10, 11</sup>.

La infección por HPV cursa asintomática en la mayor parte de los casos, salvo en el HPV-6 y HPV-11 que pueden producir verrugas genitales pero no son carcinogénicos. La infección se puede resolver en 2-4 meses por ataque inmunológico del huésped. Está plenamente establecida la relación del HPV con el cáncer de cérvix, detectándose DNA viral en el 90.7 al 96.6% de las pacientes con cáncer de cérvix<sup>9</sup>. No obstante, solo una minoría de las mujeres con infección por HPV desarrollaran cáncer de cérvix. En un amplio estudio, que incluyó a 20.000 pacientes, la incidencia de *cervical intraepithelial neoplasia-3* (CIN-3) o cáncer de cérvix en las pacientes HPV positivo fue del 7%<sup>12</sup>. Por ello, hoy día se considera la infección por HPV una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de un cáncer de cérvix.

Existen otros factores que incrementan el riesgo de cáncer de cérvix entre los que se encuentran:

Anticonceptivos orales: aunque no hay unanimidad en los estudios publicados, la IARC ha realizado un análisis agrupado de diversos estudios estimando un incremento del riesgo en las mujeres que habían tomado anticonceptivos con una *odds ratio* (OR) de 1.4<sup>13</sup>. Este estudio demostró también una relación con el tiempo de toma de anticonceptivos. No hubo riesgo de cáncer cervical invasivo para tratamiento inferior a 4 años, incrementándose este 4 veces para tratamientos superiores a 5 años (OR: 4; 95% CI: 2.1-5.5)<sup>13</sup>.

Número de partos: en la mayor parte de los estudios se ha encontrado un incremento del riesgo de cáncer de cérvix invasivo o in situ con el número de partos. El riesgo de padecer cáncer cervical en pacientes HPV positivo es cuatro veces mas alto en pacientes con más de 7 partos respecto a las nulíparas y, además este riesgo se incrementó linealmente<sup>14</sup>.

Tabaco: en un amplísimo estudio de casos-control (EPIC cohort) las pacientes fumadoras tuvieron un riesgo de cáncer de cérvix 2 veces superior a las no fumadoras (HR: 1.9, 95% CI 1.4-2.5)<sup>15</sup>. El tabaco incrementa la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 aumentando el daño al DNA y el potencial carcinogénico del HPV<sup>16</sup>.

Coinfecciones: se ha publicado que la infección por *Chlamydia trachomatis*<sup>17</sup> y *herpes simplex virus-2* (HSV-2)<sup>18</sup> incrementan al doble el riesgo de padecer cáncer cervical; sin embargo, una revisión sistemática reciente ha concluido que la infección por HSV-2 no incrementa el riesgo<sup>19</sup>.

### **1.1.3 Anatomía patológica**

**Lesiones preinvasivas:** el cáncer de cérvix invasivo es la fase final de una serie de cambios progresivos que se producen en el epitelio cervical que consisten en el acumulo de atipias y malignización de las células, siendo la infección por HPV la responsable de estos cambios. La infección por HPV producen diversas lesiones preinvasivas, algunas de ellas reversibles, que pueden evolucionar a carcinoma infiltrante en el transcurso de varios años. Las pacientes con carcinoma *in situ* (CIS) son 10-15 años más jóvenes que las diagnosticadas con cáncer invasivo<sup>20</sup>, por lo que este puede ser el período de evolución más probable. Dado que la toma de muestras del área cervical es muy accesible, desde hace años se han desarrollado programas de detección precoz cuyo objetivo es detectar estas lesiones preinvasivas y evitar su progresión a tumor infiltrante.

Debido a la variedad de alteraciones que pueden producirse desde hace décadas se han intentado sistematizar estos cambios con objeto de dirigir la prevención, seguimiento y tratamiento. Desde el concepto mas anticuado de displasia se ha evolucionado a clasificaciones con más sentido clínico y mayor precisión diagnóstica. Una de las mas aceptadas es la clasificación de Bethesda, avalada por el National Cancer Institute, que ha sido revisada en 2001<sup>21</sup>. En la Tabla I se observan las equivalencias entre distintos sistemas basados en la evaluación de citologías o biopsias cervicales.

Tabla I: comparativa de diversos sistemas de clasificación de hallazgos en citología y biopsia.

Papanicolau	Displasia	Bethesda	CIN
Clase I	Normal	Normal	Ausente
Clase II	Atipia inflamatoria	Infección específica	
		Reactivos y reparativos	
Clase IIR	Atipia escamosa	ASC (ASCUS, ASCH)	
	Atipia HPV	LSIL	
	Displasia leve		CIN 1
Clase III	Displasia moderada		CIN 2
	Displasia severa	HSIL	
Clase IV	CIS		CIN 3
Clase V	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	

CIN: cervical intraepithelial neoplasia; ASC: atypical squamous cells; ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance; ASCH: atypical squamous cells cannot exclude HSIL; LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesions; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; HSIL: high grade squamous intraepithelial lesions; CIS: carcinoma in situ

La característica histológica de la *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN) son aneuploidia nuclear, figuras mitóticas anormales y pérdida de la maduración del epitelio. Aunque la CIN es un continuo de cambios, se la ha subdividido en tres categorías en función del nivel de epitelio anormal: CIN 1, con afectación del tercio interno del epitelio; CIN 2, afectación de los 2/3 inferiores; y CIN 3, donde los cambios ocurren en todo el espesor del epitelio.

El sistema de Bethesda define una entidad para describir las atipias vistas en citología: *squamous intraepithelial lesions* que pueden ser de bajo (LSIL) o alto grado (HSIL). Las LSIL se caracterizan por displasia leve y se corresponde con los cambios producidos por el HPV. Las pacientes con HSIL tienen un riesgo del 75% de tener un CIN 1 ó 2 y del 1-2% de progresión a infiltrante.

Una categoría contemplada por el sistema de Bethesda es la *atypical squamous cells of undetermined significance* (ASCUS) que comprende aquellas anomalías celulares

que son más marcadas que los cambios reactivos pero cuantitativa o cualitativamente no son suficientes para categorizar la citología como *squamous intraepithelial lesión* (SIL)<sup>21</sup>. En la revisión de 2001 se incluyó una categoría intermedia entre la ASCUS y la HSIL que se ha denominado *atypical squamous cells cannot exclude HSIL* (ASCH). Esta distinción tiene un sentido clínico ya que las pacientes con ASCUS tienen un riesgo de tener CIN 2 o CIN 3 del 5-17%, mientras que estas cifras son del 24-94% para el ASCH<sup>22</sup>. El riesgo de cáncer invasivo con ASC es bajo situándose entre el 0.1-0.2%<sup>22</sup>.

**Historia natural de las lesiones preinvasivas:** La progresión a tumor infiltrante en pacientes con lesiones preinvasivas oscila del 1-33% dependiendo del tipo de lesión, encontrándose una regresión de las mismas en un 30-60%. Un estudio en 15000 pacientes mediante citología y biopsia objetivó progresión a cáncer de cérvix en el 1%, 5% y 12% para CIN1, CIN2 y CIN3, respectivamente<sup>23</sup>. Las tasas de progresión son más altas en el caso del CIS, con unas cifras del 28-33% en pacientes no tratadas<sup>24</sup>, lo cual justifica un tratamiento agresivo precoz en estas pacientes. En un amplio metanálisis en pacientes evaluadas por citología, la progresión a tumor infiltrante a 2 años fue del 0.15% para LSIL y del 1.4% para HSIL, justificando este período como seguro para seguimiento por citología<sup>25</sup>.

**Carcinoma infiltrante:** La clasificación de la *Organización Mundial de la Salud* (OMS)<sup>26</sup> (Tabla II) divide los tumores de cérvix en varios apartados de los cuales los tumores escamosos y los adenocarcinomas son las más frecuentes. Más del 80-90% de los cánceres de cérvix son epidermoides. Este tipo histológico se ha dividido en 3 subtipos: queratinizante de células grandes, no queratinizante de células grandes y células pequeñas; aunque esta clasificación no tiene gran repercusión en el manejo de las pacientes. Otras variantes son menos frecuentes y suelen ser tratadas de la misma forma que el resto. El tipo papilar puede ser bien diferenciado, asociado a condilomas; o poco diferenciado, parecido a un transicional de alto grado. El carcinoma verrucoso está bien diferenciado y la distinción con los condilomas es dificultosa en ocasiones.

Tabla II: Clasificación histológica de la OMS.

EPITELIAL ESCAMOSO	EPITELIAL GLANDULAR	OTROS EPITELIALES
<b>Ca escamoso</b> Queratinizante No queratinizante Basaloide Verrucoso Warty Papilar Linfoepitelioma-like Escamotransicional	<b>Adenocarcinoma</b> Mucinoso Endocervical Intestinal Anillo de sello Desviación mínima Villoglandular Endometrioides Células claras Seroso papilar Mesonefrico	<b>Ca adenoescamoso</b>
		<b>Glassy cell carcinoma</b>
		<b>Ca adenoide quístico</b>
		<b>Ca adenoide basal</b>
		<b>NEUROENDOCRINOS</b>
<b>Ca escamoso preinvasivo</b> CIN Ca escamoso in situ	<b>Adenoca. preinvasivo</b> Displasia glandular Adenoca in situ	Carcinoid Carcinoide atípico Célula pequeña Célula grande
		<b>INDIFERENCIADO</b>
<b>Lesión escamosa benigna</b> Condiloma acuminado Papiloma escamoso Pólipo fibroepitelial	<b>Lesión glandular benigna</b> Papiloma muleriano Pólipo endocervical	<b>MELANOCÍTICOS</b>
		Melanoma maligno Nevus azul
<b>MESENQUIMALES</b>	<b>MIXTOS</b>	<b>GERMINALES</b>
		Yolk sac Quiste dermoide Teratoma quístico madura
Leiomioma Sarcoma endometrioides Sarcoma indiferenciado Sarcoma botryoides Sarcoma alveolar Angiosarcoma Vaina nerviosa Leiomyoma Rabdomioma	Carcinosarcoma Adenosarcoma Tumor de Wilms Adenofibroma Adenomioma	<b>LINFOMA</b>
		<b>TUMORES SECUNDARIOS</b>

El adenocarcinoma de cérvix se presenta en el 7-10% de las pacientes. El origen está en la mucosa del endocervix y la mayor parte de los casos son de tipo endocervical o mucinoso. En un estudio que determinó la incidencia de HPV en adenocarcinoma encontró un 71% de casos positivos en la variante clásica mientras que en el resto de variantes solo encontró HPV positivo en menos del 25%<sup>27</sup>. Globalmente se estima un rango de HPV positivo de 80-85% de los casos de adenocarcinoma, inferior a la del epidermoide (Pimenta2013). Los subtipos mas frecuentes son el HPV-16 (41.6%), HPV-18 (38.7%) y HPV- 45 (7%)<sup>27,28</sup>.

En ocasiones los adenocarcinomas poseen un componente escamoso, constituyendo este grupo los carcinomas adenoescamosos. Una variante poco diferenciada de este

último es el denominado *glassy cell* carcinoma, que se asocia con peor pronóstico<sup>29</sup>. Otras variantes del adenoescamoso son el adenoide basal y el adenoide quístico. El carcinoma adenoide basal es un tumor bien diferenciado y de buen pronóstico mientras que el adenoide quístico tiene un comportamiento más agresivo<sup>30</sup>.

Otros tipos histológicos más raros son el adenoca endometrial, carcinoma neuroendocrino de células pequeñas, adenosarcomas o linfomas.

#### **1.1.4 Clínica y estadificación**

Generalmente, las lesiones preinvasivas y la enfermedad microinvasiva no suelen producir ningún síntoma. Cuando estos aparecen, los más frecuentes son sangrado vaginal espontáneo o postcoital, secreción en agua de lavar carne y dispareunia. En casos más avanzados puede añadirse dolor pélvico y cuando este se localiza en el flanco y se acompaña de edema de miembros inferiores sugiere la existencia de hidronefrosis. La hematuria o el estreñimiento, así como la fístula rectovaginal pueden aparecer en casos muy avanzados.

En cuanto al diagnóstico precoz el cáncer de cérvix presenta unas características que lo hacen idóneo para desarrollar programas de cribaje: larga duración del período preinvasivo; alta prevalencia de las alteraciones celulares; y alta sensibilidad de la citología. Estos programas de cribaje han conseguido una disminución de la mortalidad por cáncer de cérvix en los países desarrollados. En Estados Unidos se ha producido una disminución de la tasa de mortalidad por cáncer de cérvix de más del 70% desde 1940<sup>31</sup>. Se ha estimado que los programas desarrollados en Reino Unido salvan 5000 vidas al año<sup>32</sup>. La *American Cancer Society* (ACS), *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* (ASCCP), y *American Society for Clinical Pathology* (ASCP) han desarrollado unas guías para el diagnóstico precoz del cáncer cervical<sup>33</sup>. Esta guía recomienda iniciar el cribaje a los 21 años, independientemente de la edad de inicio de la actividad sexual. Entre 21-29 años se recomienda una citología cada 3 años, sin realizar detección de HPV. Para el grupo comprendido entre 30 y 65 años se recomienda citología y test de HPV cada 5 años (preferido) o citología cada 3 años (aceptable). Por encima de 65 años no se recomienda el cribaje si se ha realizado



correctamente el seguimiento previo, salvo en mujeres con historia de CIN-2 que deben ser seguidas hasta 20 años después. En caso de citología negativa y HPV positivo se deberán repetir ambas pruebas en 1 año, o bien, realizar serotipado inmediato para HPV-16 y HPV-18, y realizar colposcopia en caso de alteración citológica o HPV-16 ó 18 positivos<sup>33</sup>.

El sistema de estadificación universalmente aceptado para el cáncer de cérvix es el definido por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), cuya última edición es de 2009, y hace coincidir con la clasificación TNM de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)<sup>34</sup>, si bien esta última es más completa.

El estadio de la FIGO (Tabla III) está basado principalmente en la exploración clínica. Los datos del examen clínico como tamaño del tumor; afectación parametrial; y afectación vaginal son tenidos en cuenta para la clasificación. Para el estudio de extensión la FIGO contempla la realización de colposcopia, histeroscopia, radiografía de tórax, urografía intravenosa (UIV), rectoscopia, cistoscopia y linfangiografía. En la actualidad, se utilizan de forma rutinaria pruebas diagnósticas como tomografía axial computerizada (TAC), resonancia magnética nuclear (RMN) o *positrón emission tomography* (PET) en el estudio de extensión, dada su utilidad para definir la extensión del tumor y la afectación ganglionar. La UIV ha dejado de utilizarse y la rectoscopia o cistoscopia se reservan para los casos de sospecha en pruebas de imagen o exploración clínica y para confirmación histológica. En la evaluación de la afectación ganglionar se utilizan pruebas de imagen como TA, RMN y PET, estando la linfografía prácticamente en desuso; o bien, técnicas quirúrgicas que permiten una evaluación patológica de los ganglios como punción aspiración con aguja fina (PAAF), laparoscopia o linfadenectomía. La utilización de TAC, RMN o PET no deben utilizarse para el estadificación FIGO, ya que pueden no estar disponibles en todos los sitios, pero son mandatorias para decidir el plan de tratamiento y el pronóstico.

El diagnóstico de cáncer de cérvix debe hacerse por examen anatómo-patológico de biopsia o pieza quirúrgica y clasificado en el subtipo histológico adecuado. En el caso de piezas quirúrgicas los requerimientos mínimos que debe incluir el informe

Tabla III: Clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) revisado en 2009<sup>34</sup>

Estadio	Descripción
I	El carcinoma está estrictamente confinado al cérvix (la extensión al cuerpo uterino debe ser descartada)
	IA
	Cáncer invasivo identificado exclusivamente microscópicamente (todas las lesiones macroscópicas, incluso con invasión superficial, son estadio IB) La invasión está limitada al estroma con una profundidad máxima de 5 mm. y una extensión horizontal menor de 7 mm.
	IA1: Invasión estromal $\leq 3$ mm. en profunda y $\leq 7$ mm. en anchura
	IA2 : Invasión estromal $> 3$ mm. y $< 5$ mm. en profundidad y $\leq 7$ mm. en anchura
	IB
II	Lesiones clínicas confinadas al cérvix o preclínicas mayores que el estadio IA
	IB1: Lesión clínica $\leq 4$ cm.
	IB2: Lesión clínica $> 4$ cm.
	II
	El carcinoma se ha extendido más allá del cérvix pero sin alcanzar la pared pélvica ni el tercio inferior de vagina
	IIA
III	Extensión a los 2/3 superiores de vagina. No afectación obvia parametrial.
	IIA1: Lesión clínica visible $\leq 4$ cm.
	IIA2: Lesión clínica visible $> 4$ cm.
	IIB
	Afectación obvia parametrial sin llegar a la pared pélvica
	El carcinoma se ha extendido a la pared pélvica. En tacto rectal no hay espacio libre de tumor entre el tumor y la pared pélvica. El tumor afecta el 1/3 inferior de vagina. Todos los casos de hidronefrosis o riñón no funcionante deben ser incluidos a menos que sea por otra causa.
IV	IIIA
	Extensión al 1/3 inferior de vagina pero no a la pared pélvica.
	IIIB
	Extensión a la pared pélvica o hidronefrosis / riñón no funcionante.
IV	El carcinoma se ha extendido fuera de la pelvis verdadera o presenta afectación clínica de la mucosa de la vejiga o del recto.
	IVA
	Extensión a órganos pélvicos adyacentes
IVB	Metástasis a distancia

anatomopatológico son tamaño tumoral, extensión a vagina o parametrios, profundidad de la invasión, afectación del espacio linfovascular, estatus y distancia a bordes quirúrgicos y afectación ganglionar. Estos factores serán tenidos en cuenta para la administración o no del tratamiento postoperatorio.

En la evaluación de la extensión del tumor primario y la afectación ganglionar se utilizan pruebas de imagen, como radiografía de tórax, TAC, RMN y PET-TAC. La RMN es más precisa que el TAC en la determinación de la extensión local del tumor y la afectación parametrial con una precisión del 75-90%<sup>35,36</sup>. El PET-TAC también puede evaluar el volumen tumoral pero hay posibilidad de falsos positivos tras la biopsia excisional<sup>37,38</sup>. En la evaluación de la afectación de vejiga y recto se utilizan la RMN y

TAC, teniendo la RMN una mayor especificidad que el TAC (91% frente a 74%)<sup>35</sup>. En varios estudios destaca el alto valor predictivo del TAC y RMN para la afectación rectal, vesical o ureteral<sup>39,40</sup>. Cualquier sospecha de afectación de vejiga o recto debe ser confirmada histológicamente mediante rectoscopia y/o cistoscopia. El edema bulloso no se considera afectación vesical.

En la evaluación de los ganglios pélvicos y paraórticos se utilizan la RMN y el TAC que utilizan criterios de tamaño, mayor de 1 cm., y morfología. Dado que puede haber metástasis en adenopatías menores de 1 cm y que los criterios morfológicos no son definitivos, la sensibilidad de ambas pruebas para la detección de adenopatías pélvicas y paraórticas es baja, aunque la RMN es mejor que el TAC (60% frente al 43%)<sup>35,41</sup>. El PET-TAC es más preciso que el TAC y RMN en la detección de metástasis pélvicas o paraórticas, con una sensibilidad de alrededor del 80%<sup>42,43</sup>. No obstante el PET-TAC sigue teniendo limitaciones en adenopatías menores de 1 cm. En la evaluación de los ganglios paraórticos la disección nodal quirúrgica es superior a las pruebas de imagen en la detección de metástasis ganglionares<sup>44,45</sup>. Se ha propuesto la realización de estadificación quirúrgica mediante laparoscopia transperitoneal ya que permite la adecuación del tratamiento a los hallazgos patológicos<sup>46</sup>. En un estudio comparativo, el pronóstico de pacientes con cáncer de cérvix fue peor en el grupo evaluado radiológicamente frente a las evaluadas quirúrgicamente (HR: 1,46 para muerte; HR: 1.35 para supervivencia libre de progresión)<sup>47</sup>.

### ***1.1.5 Patrón de crecimiento***

Como se ha comentado en la sección 1.1.3, el cáncer de cérvix se produce a partir de lesiones preinvasivas que sufren una evolución progresiva hacia una displasia cada vez más severa hasta llegar al carcinoma invasivo, tras pasar por carcinoma *in situ*. Las lesiones preinvasivas se sitúan principalmente en la unión escamo-columnar desde donde se produce el crecimiento tumoral hacia el ectocérvix y, en profundidad, hacia el estroma endocervical. A partir de aquí se produce crecimiento local, afectación ganglionar pélvica y diseminación a distancia. La extensión local se refleja en la clasificación de la FIGO, desde la enfermedad microscópica hasta la afectación de

parametrios y órganos adyacentes. El patrón de crecimiento más frecuente es el exofítico, con mayor o menor grado de ulceración, seguido del endofítico.

El tumor crece afectando a todo el cérvix, pudiendo alcanzar un gran tamaño antes de extenderse fuera del mismo, como es el caso del estadio IB *bulky* mayor de 4 cm. Los tumores de cérvix pueden extenderse hacia el fórnix vaginal, el tejido paracervical o parametrial y cavidad endometrial. En fases más avanzadas el tumor invade los órganos vecinos, como recto o vejiga. En una serie quirúrgica<sup>48</sup> se observó extensión a parametrio anterior en el 23% de los casos y a parametrio posterior y septo recto-vaginal en el 15% de las pacientes. La afectación del estroma endometrial se produce en el 10-30% de los casos, constituyendo este hecho un factor de mal pronóstico con disminución de la supervivencia y aumento de las metástasis a distancia<sup>49,50</sup>.

El cáncer de cérvix puede extenderse a los ganglios linfáticos parametriales, obturadores, ilíacos internos y externos, íliaca común, presacros y paraórticos. La incidencia de ganglios patológicos depende principalmente del estadio tumoral, El riesgo de afectación nodal en series quirúrgicas es del 14 - 17% para estadios IB<sup>51-53</sup>; del 19.8% para estadios IIB<sup>53</sup>; y del 28% para los estadios IIIB<sup>53</sup>. La afectación de paraórticos también está relacionada con el estadio situándose en un 2 a 8%, 16 a 28% y 25 a 30% para estadios I, II y III, respectivamente<sup>54,55</sup>. La afectación de los ganglios parametriales, que pueden considerarse como la primera estación ganglionar, predice la positividad de los ganglios pélvicos. Cuando hay adenopatías parametriales la afectación pélvica es del 80% frente al 26% cuando esta no existe<sup>56</sup>.

La diseminación a distancia no es frecuente aunque se incrementa claramente con el estadio. En una serie larga de pacientes tratadas con radioterapia exclusiva la probabilidad actuarial a 10 años de metástasis a distancia fue del 3% en estadios IA, 16% en estadios IB, 31% en estadios IIA, 26% en estadios IIB, 39% en estadios III y 75% en estadios IV<sup>57</sup>. Los órganos más frecuentemente afectados por metástasis son el pulmón, cavidad abdominal, hígado y tránsito gastrointestinal.

### ***1.1.6 Factores pronósticos clínico-patológicos***

**Edad:** los estudios publicados en cuanto al valor pronóstico de la edad son contradictorios. Dattoli et al<sup>58</sup> encuentran una peor supervivencia y control local significativos en pacientes menores de 40 años. Mientras que otros autores no encuentran diferencias en base a la edad de las pacientes<sup>59-61</sup> o, incluso, reportan una mejor supervivencia y control local en las pacientes mas jóvenes<sup>62, 63</sup>, destacando en este último grupo un amplio estudio en 10.022 p. quienes encuentran una supervivencia a 5 años mejor en las pacientes menores de 40 años del 69% frente a 45% en las pacientes mayores<sup>62</sup>.

Dado que no hay resultados concluyentes en cuanto al valor pronóstico de la edad, se ha argumentado que el mal pronóstico fuera debido a la presencia de otros factores de mal pronóstico en este grupo de edad. En un estudio de comparación por pares, las pacientes menores de 35 años presentaron estadios tumorales mayores lo que podría explicar su peor pronóstico. En este mismo sentido, un estudio que determinó el Ki67 en pacientes con cáncer de cérvix tratado con radioterapia demostró una correlación significativa entre la expresión de Ki67 y la edad de la paciente ( $p=0.007$ ) sugiriendo que la agresividad biológica está ligada a la edad<sup>64</sup>. Los mismos resultados se objetivaron en otro estudio en pacientes tratadas quirúrgicamente en el cual el 17.1% de las pacientes  $\leq 40$  años presentaron positividad a Ki67 frente al 16.3% en las pacientes mayores ( $p=0.006$ )<sup>65</sup>.

**Anemia:** la anemia es un factor pronóstico descrito en muchas series, lo que ha motivado que la realización de transfusiones de hematíes en pacientes con niveles bajos de Hb sea una práctica habitual. Dichas transfusión persiguen dos objetivos: por un lado, la mejoría subjetiva del paciente; y, por otro, mejorar la oxigenación tumoral lo cual aumentaría la respuesta a la radioterapia. Sin embargo, este aumento de la radiosensibilidad con las transfusiones depende del tiempo de instauración de la misma. Basándose en estudios con animales, se ha sugerido que el aumento de la radiosensibilidad tras la mejora de los niveles de Hb es transitoria y solo se produce en la anemia aguda; mientras que en la anemia crónica, que es la habitual en los tumores,

se producen fenómenos adaptativos y este efecto no se produce<sup>66</sup>. Estos mecanismos adaptativos producen un desplazamiento de la curva de oxihemoglobina hacia la derecha con un incremento compensatorio de la cantidad de oxígeno liberada a los tejidos<sup>67</sup>. Además, la disminución de Hb produce una menor viscosidad que mejora el flujo a los tejidos<sup>67</sup>.

Los niveles de Hb pretratamiento son un factor pronóstico negativo referido en varias series, con una supervivencia a 5 años del 62-79%, para pacientes con Hb  $\geq 12$  gr/dl, frente al 27-51%, en pacientes anémicas<sup>68-70</sup>. La disminución de los niveles de Hb durante el tratamiento también tiene un impacto negativo en supervivencia, ya que un nadir de Hb  $< 11$  gr/dl tiene una supervivencia a 5 años del 43% frente al 74% para nadir de Hb  $> 12$  gr/dl<sup>70</sup>.

**Estadio:** si bien el estadio FIGO no incorpora algunas características importantes, como la afectación ganglionar, posee un valor pronóstico aceptado universalmente.

En una amplia serie de pacientes con cáncer de cérvix invasivo tratadas con radioterapia radical, la supervivencia libre de enfermedad actuarial a 5 años fue de 85%, 70%, 72% y 52% para estadios I, IIA, IIB y III, respectivamente<sup>71</sup>. La recidiva pélvica fue también mayor en estadios avanzados (9.6%, 20%, 41% y 75% para estadios I, II, III y IV, respectivamente)<sup>71</sup>. El estadio FIGO también fue predictivo de metástasis a distancia, observándose cifras que oscilaron entre el 17.5%, en estadio IB, y el 80%, para el estadio IVA<sup>71</sup>. El peor pronóstico del estadio IVA también se confirmó en otro estudio que objetivó una supervivencia actuarial a 3 años de 60%, 65% y 29% para estadios IIB, IIIB y IVA, respectivamente, siendo la diferencia significativa para el estadio IVA ( $p=0.006$ )<sup>69</sup>. En un estudio en pacientes con adenocarcinoma el estadio FIGO fue un potente factor pronóstico en el análisis multivariante, mostrando estas pacientes una supervivencia causa-específica a 5 años de 80%, 37% y 11% para los estadios I, II y III ( $p<0.001$ )<sup>61</sup>.

En un análisis de regresión múltiple, Fyles et al.<sup>63</sup> encuentran una supervivencia libre de enfermedad actuarial a 5 años del 78%, 78%, 61%, 41% y 19% para estadios I, IIA, IIB, III y IV, respectivamente<sup>63</sup>. En el análisis multivariante, tomando como referencia

los estadios I-IIA (RR: 1), presentaron más riesgo de recidiva o muerte los estadios IIB (RR:1.94,  $p=0.0001$ ); III (RR:3.04,  $p=0.0001$ ); y IVA (RR:6.59,  $p=0.0001$ )<sup>63</sup>.

En otro análisis multivariante de enfermas incluidas en protocolos del *Gynecologic Oncology Group* (GOG), el riesgo de muerte fue mayor en estadios avanzados; I (RR:1); II (RR:1.2); III (RR:1.7); y IV (RR:2.1), alcanzado estas diferencias significación estadística ( $p=0.03$ )<sup>72</sup>.

**Tamaño tumoral:** aunque el estadio FIGO está indirectamente basado en el tamaño tumoral, esta relación no siempre es directa. El volumen tumoral es un potente factor pronóstico que es referido como independiente del estadio en muchas series. En pacientes con estadios IB, diversos autores han mostrado que las pacientes con un tamaño tumoral mayor de 4-5 cm tienen una peor supervivencia causa específica<sup>73-75</sup>, libre de enfermedad<sup>76</sup>, y, también, mayor recidiva pélvica<sup>77</sup>.

**Afectación ganglionar:** la afectación ganglionar se ha mostrado consistentemente como un factor de mal pronóstico con un impacto considerable en la supervivencia. Globalmente, las cifras de supervivencia a 5 años están entre 80-90%, en pacientes sin metástasis ganglionares; 50-60%, con afectación ganglionar pélvica; y 20-30%, para metástasis paraórticas. En un análisis de las series publicadas, Creasman y Kohler<sup>78</sup> encuentran que la afectación ganglionar es el factor pronóstico independiente más frecuentemente reportado hasta en el 91% de los estudios.

En una revisión de protocolos del GOG las pacientes con ganglios positivos presentaron el doble de riesgo de recidiva y muerte<sup>72</sup>. En una serie de pacientes tratadas con radioterapia<sup>74</sup> también se confirma el peor pronóstico de las pacientes con enfermedad ganglionar, tanto para supervivencia como diseminación a distancia.

Pitson et al.<sup>75</sup>, en un análisis de factores predictivos de afectación ganglionar, encuentra que los tumores hipóxicos (medida mediante sonda de Eppendorf) presentaron una mayor incidencia de ganglios positivos (67% frente al 40%,  $p=0.014$ ). Igualmente, el tamaño tumoral > 5 cm y los niveles de Hb<11 se asociaron con enfermedad nodal (67% frente a 37%,  $p=0.01$ ; y 31% frente a 7%,  $p=0.002$ )<sup>75</sup>.

**Histología:** el carcinoma epidermoide surge en la unión escamo-columnar, entre el epitelio escamoso del ectocérvix y el columnar del endocérvix, siguiendo la progresión clásica desde displasia a carcinoma in situ e invasivo. El adenocarcinoma procede de lesiones precursoras en la mucosa endocervical y comprende diversos subtipos histológicos. Cuando se compara con el epidermoide, la incidencia del adenocarcinoma se ha incrementado en los últimos años del 12%, en los años 70, al 24%, en los 90<sup>79</sup>. Una posible causa sería la más fácil detección del epidermoide frente al adenocarcinoma en los programas de cribaje. Por otro lado, la proporción de HPV18 respecto al resto de subtipos en el adenocarcinoma es del 50% frente al 15% en el epidermoide<sup>80</sup>.

Existe controversia acerca de si la histología es un factor pronóstico independiente en cáncer de cervix. Aunque algunas series quirúrgicas no han mostrado diferencias en supervivencia entre adenocarcinoma y epidermoide<sup>81-85</sup>, la mayoría han mostrado un peor pronóstico para el adenocarcinoma con un 10-20% de diferencia con el epidermoide<sup>86-93</sup>.

Existe la posibilidad de una posible diferencia en el proceso de carcinogénesis y progresión tumoral entre el adenocarcinoma y el epidermoide que podría justificar las diferencias en la evolución clínica de estas dos variedades. Las pacientes con adenocarcinoma presentan una menor incidencia de HPV positivo que el epidermoide y una distribución de los subtipos de HPV diferente<sup>27,94,95</sup>. También se ha encontrado un patrón molecular diferente en el adenocarcinoma con una menor positividad de EGFR<sup>96-100</sup>; p53 negativa<sup>101</sup>; y positividad de COX2<sup>100,102-104</sup>.

**Marcadores séricos:** el marcador tumoral *squamous cell carcinoma antigen* (SCCA) pertenece a una familia de inhibidores de proteasas que está presente en el tejido epitelial cervical normal y aumenta su expresión en cáncer de cervix<sup>105</sup>. Su utilidad clínica es muy debatida. En un estudio<sup>106</sup> su elevación pretratamiento estuvo relacionada con mayor volumen tumoral pero no sirvió para identificar pacientes en riesgo de afectación linfática metastásica o afectación parametrial. En estadios precoces, la elevación pretratamiento del SCCA se correlaciona con el control local y la



supervivencia en análisis multivariante<sup>107,108</sup>. Reesink-Peters et al. encuentran que la elevación de SCCA predijo la recidiva de forma más precisa que los factores patológicos convencionales en pacientes con estadios precoces tratadas con cirugía<sup>109</sup>. En cáncer de cérvix avanzado los valores pre y postradioterapia se correlacionan con la supervivencia global y el control local<sup>110, 111</sup>. El SCCA se eleva en la recidiva en un 46-92% de los casos precediendo al diagnóstico clínico en unos 3-8 meses<sup>112</sup>. Sin embargo, no existen evidencias definitivas de que el uso del SCCA en la detección de la recidiva mejore la supervivencia. Dado que el rescate de la recidiva de cáncer de cérvix es bajo, especialmente en diseminación a distancia, el coste-beneficio ha sido cuestionado<sup>113</sup>.

### **1.1.7 Tratamiento**

El tratamiento del cáncer de cérvix se basa fundamentalmente en el estadio tumoral y diversos factores pronósticos del huésped o del tumor. Las dos modalidades del tratamiento son la cirugía y la radioterapia, combinada o no con quimioterapia.

**Técnicas quirúrgicas:** la técnica quirúrgica se elige en función del estadio tumoral, la extensión tumoral y determinados factores de riesgo. Las técnicas mas utilizadas son:

- Conización cervical simple: en lesiones preinvasivas.
- Traquelectomía radical: consiste en la extirpación de la totalidad del cuello uterino y parte del parametrio. Debe realizarse PET y RMN para descartar afectación ganglionar o extensión al canal endocervical. Debería acompañarse de una linfadenectomía laparoscópica. Podría ser utilizada en pacientes con estadios precoces. IA-IB1, que desean preservar la fertilidad sin invasión linfovascular ni endocervical superior y que no tengan adenopatías clínicamente patológicas.
- Histerectomía total abdominal (extrafascial): extirpación del cérvix, un pequeño manguito vaginal y los tejidos paracervicales.
- Histerectomía radical modificada: se reseca la totalidad del cérvix, tejidos paracervicales y parametrial, así como un manguito vaginal, Se realiza también una linfadenectomía pélvica.

- Histerectomía radical abdominal (Wertheim-Meigs): incluye el cérvix, parametrios hasta pared pélvica y un manguito vaginal de 2-3 cm., así como una linfadenectomía radical bilateral.
- Histerectomía radical ampliada: incluye 2/3 superiores de vagina y una resección mas amplia de los tejidos paracervicales.

Actualmente se realiza disección ganglionar paraaórtica, habitualmente por vía laparoscópica, lo que proporciona información pronóstica. Las pacientes con afectación paraórtica tienen un riesgo de muerte 6.2 veces superior y, además, mayor riesgo de recidiva pélvica<sup>54</sup>. En los estudios en los que se realiza disección paraórtica previa a la radioterapia se ha visto una mejor supervivencia en los pacientes con resección frente a las adenopatías irresecables<sup>114,115</sup>. La resección de los ganglios paraórticos también permite disminuir la dosis a 45-50 Gy disminuyendo las complicaciones, especialmente si se usa IMRT<sup>116</sup>.

**Técnicas de radioterapia:** la radioterapia combinada con braquiterapia para el tratamiento del cáncer de cérvix fue uno de los primeros tratamientos exitosos en esta enfermedad. Desde los inicios, hace más de 100 años, las técnicas han evolucionado enormemente, especialmente en los últimos 30 años. La radioterapia, combinada actualmente con quimioterapia, se usa como tratamiento radical en los estadios IB2-IVA antes de la braquiterapia endocavitaria; mientras que en los estadios IA-IB1 se reserva para pacientes no operables o que rechazan la cirugía. En la enfermedad diseminada puede tener un papel como tratamiento paliativo.

**Radioterapia externa:** Las técnicas de planificación y tratamiento han evolucionado desde la planificación 2D, en la que se delimita el volumen en placas radiográficas y se realiza el tratamiento a través de 3 ó 4 campos; pasando por la planificación 3D, en la que se utiliza un TAC y múltiples haces de tratamiento; hasta la radioterapia de intensidad modulada (*intensity modulated radiotherapy, IMRT*), con planificación inversa y el uso de muchas incidencias con haces modulados. El proceso de tratamiento consta de varias fases con características particulares según el tipo de técnica que vaya a utilizarse: simulación, planificación, tratamiento y controles<sup>117</sup>.

Simulación: la paciente se posiciona habitualmente en decúbito supino, que es la posición estándar si se va a realizar IMRT. El posicionamiento en decúbito prono asociada al uso de dispositivos, como el belly board, puede ayudar a desplazar las asas intestinales del campo de irradiación. El uso de contraste intravenoso (CIV) es recomendable ya que ayuda a localizar el paquete vascular en la delineación de los ganglios pélvicos. El contraste oral o marcadores diversos son opcionales.

En los casos en que no se disponga de TAC, situación poco frecuente en la actualidad en nuestro país, la simulación se realiza mediante 2 placas radiográficas ortogonales, AP y lateral, en las que se delimitarán los volúmenes para su tratamiento mediante técnicas 2D. El límite superior del campo se sitúa en L4-L5, para cubrir la íliaca común; el inferior en la parte inferior del agujero obturador ampliándose hasta la tuberosidad isquiática en caso de afectación vaginal extensa; y los laterales a 1.5-2 cm. por dentro del marco óseo pélvico. Si la afectación vaginal afecta al tercio inferior se deben incluir los ganglios inguinales y colocar un marcador radiópaco en la parte más distal del tumor.

En los tratamientos 3D se realiza un TAC pélvico, incluyendo paraórticos si procede, junto con la administración de CIV y, opcionalmente, contraste oral. En este TAC se van a delimitar tanto el tumor y regiones a tratar como los órganos sanos. En la delimitación del volumen de tratamiento se usa la terminología recomendada por la ICRU 62<sup>118</sup>: GTV, *gross tumour volume* o enfermedad macroscópica visible en pruebas de imagen; CTV, *clinical tumour volume* que incluye el GTV y aquellas áreas en riesgo de presentar afectación; y PTV, *planning tumour volume* que incluye un margen adicional para tener en cuenta los movimientos de órgano y la incertidumbre de la técnica de tratamiento. En el caso del cáncer de cérvix estos volúmenes son<sup>117</sup>:

- GTV: Comprende toda la extensión tumoral macroscópica detectada en la exploración ginecológica junto con el tumor visible en RMN o TAC.
- CTV: Incluye el GTV, el cérvix en su totalidad, el útero y anejos, la mitad interna de los parametrios, los ligamentos uterosacros, el tercio superior de la vagina y las cadenas ganglionares de drenaje. En caso de afectación

parametrial, se incluirá el parametrio en su totalidad con 1 cm de margen. Si existe extensión vaginal se incluirá toda la zona vaginal afecta con 1 cm de margen.

- PTV: CTV más un margen que debe ser definido en cada centro. Se recomienda la expansión del CTV a 10-15 mm en todas las direcciones (excepto en dirección superior que debe ser de 2 cm) para producir el PTV. A las regiones vasculares delimitadas en la TAC se le añade un margen de 1,5 cm para delimitar las áreas ganglionares.

El tratamiento se realiza en aceleradores lineales utilizando una energía de 10-15 Mv, en el caso de planificación 3D; o de 6 Mv, en el caso de IMRT para aumentar la homogeneidad. Habitualmente, se utiliza un fraccionamiento estándar de 1.8-2 Gy/f hasta una dosis total de 45-50 Gy en todo el volumen. En aquellas pacientes no candidatas a braquiterapia se realiza una sobredosificación sobre el tumor macroscópico hasta 65 Gy.

Braquiterapia: fue una de las primeras formas de irradiación utilizadas en el tratamiento del cáncer de cérvix, a principios del siglo pasado. Desde entonces ha evolucionado hacia un mejor control de la dosis administrada, así como de las dosis que reciben los órganos sanos circundantes, lo que minimiza la toxicidad que, actualmente, se mantiene en niveles muy aceptables. Forma parte del tratamiento estándar en los estadios IB2-IVA, tras la radioterapia externa y puede ser usada como tratamiento definitivo en los estadios IA1-IB1. En el caso del cáncer de cérvix se usa la braquiterapia intracavitaria mediante la inserción de aplicadores cargados con fuentes radiactivas en la cavidad uterina y el fondo vaginal.

Según la tasa de dosis administrada la ICRU<sup>119</sup> ha definido 3 tipos de braquiterapia: baja tasa (*low dose rate*, LDR), 0.4-2 Gy/h; tasa media (*médium dose rate*, MDR), 2-12 Gy/h; y alta tasa (*high dose rate*, HDR), >12 Gy/h. Aunque se pueden utilizar diversos isótopos, lo habitual es utilizar <sup>137</sup>Cs en LDR e <sup>192</sup>Ir en HDR y MDR. Actualmente la mayor parte de los centros utilizan HDR ya que no se han objetivado diferencias ni en cuanto a control de la enfermedad ni en la toxicidad y evita un ingreso de la paciente

optimizando los recursos de los servicios. En un metanálisis de varias series con 1260 pacientes se ha demostrado que no existen diferencias entre braquiterapia LDR y HDR en supervivencia, control local, tasa de metástasis ni complicaciones<sup>120</sup>. No obstante, desde el punto de vista radiobiológico puede ser perjudicial administrar las dosis altas por fracción que se usan en la HDR, por ello es mandatorio la planificación 3D, con TAC o RMN, y la separación del recto y la vejiga de las fuentes. Por otro lado, el número de aplicaciones y las dosis usadas en la HDR deben ser ajustadas a las dosis equivalentes administradas en LDR para evitar un incremento de las complicaciones.

El procedimiento para la realización de braquiterapia ginecológica ha sido consensuado por la American Brachytherapy Society (ABS)<sup>121-123</sup>. Los aplicadores mas usados consisten en una sonda intrauterina y unos ovoides vaginales, que pueden ser colpostatos de Fletcher, el cual asegura un cubrimiento adecuado del tumor y áreas adyacentes. El procedimiento se realiza en quirófano siendo recomendable el uso de una ECO en tiempo real que ayuda al posicionamiento de la sonda disminuyendo el riesgo de perforación. Tras la aplicación se realiza el control del pocionamiento de las fuentes y la planificación mediante radiografías ortogonales, TAC o RMN. En el caso de HDR la planificaión se realiza sobre TAC de planificación siendo recomendable el uso de RMN.

Históricamente se desarrollaron diversos sistemas de prescripción siendo los mas conocidos el sistema de París, el de Manchester y el de Estocolmo. Para la prescripción de la dosis, el sistema de Manchester<sup>124</sup> definió los puntos A, que representaban la dosis en los tejidos paracervicales; y B, considerados como una estimación de la dosis en los ganglios obturadores. Parte de la forma de prescripción moderna se basa en este sistema. El punto A fue redefinido en 2012 por la ABS<sup>121</sup> como un punto situado 2 cm. Por encima de la parte superior de los ovoides vaginales, siguiendo el eje longitudinal de la sonda intrauterina, y 2 cm. lateralmente a ambos lados de la sonda. En la planificación por TAC se siguen las reglas generales de definición de volúmenes definiendo un CTV que incluye el cérvix y cualquier extensión parametrial, ligamentos uterosacros y la longitus del tandem. Cada vez mas frecuentemente se utiliza RMN para la planificación, habiéndose publicado guías de contorno<sup>125</sup>, que definen un GTV,

que incluye el tumor y áreas hiperintensas en T2; un HR-CTV (*high risk CTV*), que comprende el cérvix y cualquier región considerada de alto riesgo; e IR-CTV, que incluye el HR-CTV mas 1 cm y áreas con potencial extensión microscópica excluyendo los órganos sanos.

En braquiterapia LDR las dosis administradas en estadios II-IVA oscilan entre 2500-4500 cGy en puntos A, dependiendo del estadio, que se administran en 1 ó 2 sesiones a los 7-14 días de finalizada la radioterapia externa.

**Tratamiento de la enfermedad avanzada:** hasta el año 2000 el tratamiento estándar de las pacientes con cáncer de cérvix estadios II-IVA era la radioterapia externa seguida de braquiterapia endocavitaria. Con la publicación de diversos estudios aleatorizados<sup>126-129</sup> que demostraban un beneficio de la quimioterapia concomitante frente a la radioterapia exclusiva, se estableció como tratamiento para la enfermedad localmente avanzada la radioquimioterapia basada en cisplatino, asociado o no a 5FU, seguida de braquiterapia. Un metaanálisis<sup>130</sup> de 19 series de tratamiento con radioquimioterapia en cáncer de cérvix encontró una ventaja para la radioquimioterapia en supervivencia global (HR: 0.71;  $p < 0.0001$ ) y supervivencia libre de enfermedad (HR: 0.61;  $p < 0.0001$ ), especialmente en los estudios que utilizaron cisplatino. El beneficio absoluto en supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global fue del 16% y 12%, respectivamente<sup>130</sup>. También se observó un beneficio significativo de la radioquimioterapia en recidiva local (HR: 0.61;  $p < 0.0001$ ) y metástasis a distancia (HR: 0.57;  $p < 0.0001$ )<sup>130</sup>. Otro metaanálisis mas reciente que comparó radioquimioterapia con radioterapia exclusiva observó un beneficio en supervivencia a 5 años del 6% (HR= 0.81;  $p < 0.001$ ) siendo este beneficio igual en pacientes que recibieron cisplatino (HR: 0.83;  $p = 0.017$ ), como otros tipos de quimioterapia (HR= 0.77;  $p = 0.009$ )<sup>131</sup>.

### **1.1.8 Toxicidad**

El tratamiento del cáncer de cérvix avanzado es la combinación de radioterapia radical y braquiterapia endocavitaria. Desde principios de los 2000, se considera estándar la administración de quimioterapia concomitante, situación que incrementa la posibilidad

de complicaciones. La cercanía del útero a diversos órganos y la relativa larga supervivencia de las pacientes tratadas por cáncer de cérvix, además de la asociación con quimioterapia, hacen que este tratamiento vaya acompañado de una serie de complicaciones tardías.

Como en cualquier otra neoplasia, el objetivo del tratamiento es conseguir el máximo control de la enfermedad con las mínimas complicaciones posibles. Las modernas técnicas de planificación 3D o IMRT favorecen la consecución de estos objetivos; sin embargo, para su correcta aplicación debemos disponer de un amplio conocimiento de las dosis de tolerancia de los diferentes órganos. En este sentido, el estudio retrospectivo de las complicaciones tardías de pacientes tratadas con radioterapia radical puede aportar una información que, aunque no sea completa, es muy útil. Una dificultad presente en el estudio de las complicaciones derivadas de la radioterapia es la falta de sistemas de clasificación uniformes y aceptados por todos que permitan la comparación de las diversas series. Actualmente se ha impuesto el *Common Toxicity Criteria of Adverse Events* (CTCAE) que va por la 4ª versión y que ha desplazado a las clasificaciones anteriormente utilizadas como las de la RTOG y LENT-SOMA.

El problema de los estudios retrospectivos en cuanto al reporte de la toxicidad es que no siempre se recoge esta adecuadamente en la historia clínica. En 1993, un grupo franco-italiano publicó un sistema de clasificación de las complicaciones del tratamiento del cáncer ginecológico denominado *French Italian Glossary*<sup>132</sup>. Se trata de una clasificación en la que se describen las complicaciones en 14 órganos y tejidos y se gradúan en una escala de 0 a IV. Este sistema presenta la ventaja de ser descriptivo y contemplar casi todas las situaciones clínicas referentes a toxicidad que pueden presentarse durante el seguimiento de las pacientes.

Se suelen considerar dos tipos de toxicidad según el momento de aparición: aguda, durante el tratamiento y hasta 3 meses después; y tardías, las que aparecen después de este período. Los efectos de la irradiación sobre los tejidos de respuesta aguda, constituidos por los epitelios, se deben a la denudación de la capa basal y la consiguiente pérdida de la barrera epitelial que da lugar a una respuesta inflamatoria

mediada por citoquinas y *tumor necrosis factor*, así como a sobreinfección y liberación de otros productos tóxicos<sup>133</sup>. Los tejidos de respuesta tardía están constituidos por los parénquimas de los órganos afectados y la toxicidad por radioterapia en ellos se debe a fenómenos vasculares y depósito de colágena que da lugar a fibrosis<sup>133</sup>. La toxicidad de los tejidos de respuesta aguda depende de la dosis total y el tiempo de tratamiento; mientras que la toxicidad de los tejidos de respuesta tardía depende de la dosis por fracción.

**Toxicidad gastrointestinal:** la toxicidad aguda está producida por la pérdida del epitelio viloso asociada a infección y cursa con diarrea y dolor abdominal. Globalmente se produce en el 5-60% de las pacientes dependiendo del tipo de irradiación, dosis y factores modificadores<sup>134,135</sup>.

La toxicidad tardía gastrointestinal está producida por fenómenos vasculares que producen sangrado, isquemia y fibrosis, las cuales pueden dar lugar a diarrea crónica, obstrucción intestinal, rectitis actínica, malabsorción y fístulas. La incidencia de complicaciones tardías moderadas/severas oscila del 8-26% de las pacientes<sup>136,137</sup>.

**Toxicidad urinaria:** la toxicidad aguda, consistente en cistitis, se debe a la pérdida del urotelio asociada a fenómenos inflamatorios y sobreinfección. La incidencia de toxicidad urinaria aguda oscila del 5-25% en las diversas series<sup>134,138</sup>.

La toxicidad urinaria tardía es debida al depósito de colágena y fibrosis, que producen disminución de la capacidad vesical; y a la proliferación vascular, que puede producir sangrado o, en casos peores, necrosis de la pared. La incidencia de toxicidad urinaria tardía es variable según las series y el tipo de toxicidad oscilando entre el 3 - 6.2% de las pacientes<sup>126,134,139</sup>.

**Vagina. Disfunción sexual:** tras radioterapia pélvica combinada con braquiterapia se produce algún grado de disfunción sexual en el 50-80% de las pacientes<sup>140-144</sup>. La disfunción sexual es debida principalmente a la fibrosis vaginal inducida por la irradiación, la cual produce estenosis y acortamiento vaginal, disminución de la



lubricación y poca elasticidad, que dan lugar a dispareunia y dificultad para alcanzar el orgasmo<sup>142</sup>.

**Toxicidad ósea:** las fracturas por insuficiencia pueden producir dolor, impotencia funcional y cambios precoces en la RMN y se suelen resolver en varios meses. El tratamiento profiláctico con calcio y bifosfonatos es eficaz en prevenir las fracturas.

El riesgo de fractura ósea ha disminuido mucho desde las series antiguas que tenían un riesgo actuarial a 10 años de fractura de cuello femoral del 15%<sup>145</sup> hasta menos del 3% en series más modernas<sup>146-148</sup>. El riesgo aumenta en pacientes mayores, osteopenia preexistente, corticoides y dosis >50 Gy<sup>149,150</sup>.

**Toxicidad de la radioquimioterapia:** En las series de radioquimioterapia no se objetiva una mayor toxicidad cuando se las compara con series antiguas, reportando algunas de ellas incluso cifras muy inferiores de toxicidad. Este hecho es debido a que las series de radioquimioterapia utilizan técnicas que preservan mejor los tejidos sanos, como planificación 3D o IMRT. Sin embargo, cuando se comparan los brazos de radioquimioterapia con los de radioterapia exclusiva en los estudios aleatorizados sí existe un aumento de la toxicidad aguda, especialmente la hematológica. En un metaanálisis<sup>138</sup> que incluyó 19 estudios aleatorizados, la radioquimioterapia presentó un riesgo mayor de toxicidad aguda grados 1-2 (OR: 1.48;  $p < 0.00001$ ) y grados 3-4 (OR: 2.44;  $p < 0.00001$ ). El incremento de la toxicidad aguda fué obviamente mas marcado en la toxicidad hematológica (OR: 31.4, 95% CI:12-78; para grados 3-4). En cuanto a la toxicidad tardía grados 3-4 se produce en el 6-23.3% de las pacientes tratadas con radioquimioterapia, cifra similar o ligeramente superior a las series de radioterapia exclusiva<sup>138</sup>.

## 1.2 Ensayos predictivos de respuesta

### 1.2.1 Concepto

A la hora de decidir la mejor opción terapéutica para un paciente determinado nos basamos en una serie de factores pronósticos clínicos, cuyo conocimiento es fruto de la experiencia y de estudios clínicos, con los que tratamos de predecir la respuesta al

tratamiento. Entre ellos hay factores relacionados con el tumor, como tipo histológico, estadio, tamaño, grado, etc.; y factores relacionados con el huésped, como edad, Karnofsky, hemoglobina, etc. La elección del tratamiento radioterápico viene determinada, asimismo, por factores técnicos como son el conocimiento de las curvas dosis-respuesta del tumor y la tolerancia de los tejidos sanos adyacentes. No obstante, estos factores pronósticos nos informan acerca de la evolución clínica de grupos de pacientes con unas características determinadas, siendo imprecisos para predecir la respuesta al tratamiento de un paciente individual. Por ello, en los años 80 y 90 se llevaron a cabo diversos intentos de desarrollar ensayos predictivos de respuesta basados en estudios de radiosensibilidad *in vitro* y medición de proliferación celular<sup>151</sup>.

Podemos definir un **ensayo predictivo** como aquel que se realiza en el laboratorio con células tumorales o normales, procedentes del paciente, cuyo resultado se correlaciona significativamente con la respuesta a la radioterapia del tumor o tejido en estudio. Actualmente, gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular, se elaboran perfiles moleculares de respuesta que son útiles en la elección del tratamiento más adecuado para un paciente concreto. Dentro de los factores determinantes de la respuesta a la irradiación se encuentran la radiosensibilidad intrínseca<sup>152</sup> y la repoblación tumoral<sup>153</sup>.

Las bases para la realización de ensayos predictivos de respuesta fueron establecidas a principios de los 80 por Fertil y Malaise<sup>152,154</sup> y Deacon<sup>155</sup> los cuales demostraron que la radiosensibilidad *in vitro* de líneas celulares de tumores de diferente histología se correlacionaba con la respuesta clínica conocida de dichos tumores a la irradiación. Este hecho indica que las células en cultivo conservan las características del tumor de origen y, por tanto, que la radiosensibilidad *in vitro* es un reflejo de la radiosensibilidad *in vivo*. Otra conclusión importante de estos trabajos fue que los parámetros relacionados con la porción inicial de la curva de supervivencia, entre los que se encuentran alfa, FS2 y dosis de inactivación media, son los que mejor describen la radiosensibilidad intrínseca de las diferentes líneas celulares. Asimismo, estos autores encontraron una amplia variabilidad en la radiosensibilidad intrínseca de tumores de

la misma histología, lo cual abría la posibilidad de predecir la respuesta individual de grupos de pacientes clínicamente homogéneos.

La hipótesis de trabajo de los estudios sobre la validez de los ensayos predictivos sería que tanto la radiosensibilidad intrínseca como la medida del Tpot están en relación con la respuesta del tumor a la radioterapia y, por tanto, podrían ser utilizados para orientación terapéutica del paciente.

### **1.2.2 Radiosensibilidad intrínseca**

Desde los inicios de la radioterapia se reconoció que tumores de diferentes histologías diferían en su radiosensibilidad. La primera clasificación de los tumores en función de su respuesta a la irradiación fue la de Paterson<sup>156</sup> el cual consideró tumores radiosensibles a los linfomas y tumores embrionarios; intermedios a los de estirpe epitelial; y radioresistentes a sarcomas y melanomas. Tras el desarrollo de los cultivos celulares se produjo el estudio de la respuesta a la irradiación, especialmente el desarrollo del modelo lineal-cuadrático. Las bases para la realización de ensayos predictivos de respuesta fueron establecidas a principios de los 80 por Fertil y Malaise<sup>152,154</sup> y Deacon<sup>155</sup> los cuales demostraron que la radiosensibilidad *in vitro* de líneas celulares de tumores de diferente histología se correlacionaba con la respuesta clínica conocida de dichos tumores a la irradiación. Para los ensayos predictivos de respuesta se asume que la respuesta de las células en cultivo refleja aquella de los tumores de los que proceden. Otra conclusión importante de estos trabajos fue que los parámetros relacionados con la porción inicial de la curva de supervivencia (alfa, FS2, dosis de inactivación media) son los que mejor describen la radiosensibilidad intrínseca de las diferentes líneas celulares<sup>152,154,155</sup>. Asimismo, estos autores encontraron una amplia variabilidad en la radiosensibilidad intrínseca de tumores de la misma histología, lo cual abría la posibilidad de predecir la respuesta individual de grupos de pacientes clínicamente homogéneos.

Aunque existen diversos sistemas de cultivo y determinación de la radiosensibilidad *in vitro*<sup>151,157</sup>, el cultivo de células tumorales presenta dificultades técnicas como bajo rendimiento celular tras la disociación enzimática; baja eficiencia de plantaje; y

contaminación por fibroblastos o células epiteliales normales. El ensayo CAM (*cell adhesive matrix*)<sup>158</sup> se basa en la utilización de placas de cultivo recubiertas de matriz adhesiva y un medio rico en factores de crecimiento. Entre sus ventajas teóricas están una eficiencia de plantaje relativamente alta; establecimiento del cultivo en un alto porcentaje de casos; y ser selectivo para células tumorales.

Los resultados de los estudios clínicos que valoran el potencial predictivo de la FS2 han sido diversos<sup>151</sup>. En algunos estudios de pacientes con cáncer de cérvix y cabeza y cuello se encontró valor pronóstico significativo<sup>159-162</sup>; mientras que otros trabajos no encuentran relación entre la FS2 y el control de la enfermedad<sup>163-165</sup>. Estas diferencias pueden ser debidas a los diferentes métodos utilizados para la evaluación de la FS2.

### 1.2.3 Repoblación tumoral. Tiempo potencial de doblamiento

La proliferación o repoblación tumoral acelerada en el curso de un tratamiento radioterápico es una causa reconocida del fracaso terapéutico en una gran variedad de tumores<sup>166</sup>. Dado que este efecto negativo puede ser minimizado o contrarrestado acortando el tiempo de tratamiento, resulta de interés disponer de ensayos que determinen la capacidad proliferativa del tumor.

La tasa de crecimiento de un tumor depende de varios factores<sup>167</sup>: duración del ciclo celular; fracción de crecimiento; y tasa de pérdida celular (Figura 2). Dada la multiplicidad de factores que influyen en el crecimiento de un tumor, la medida de la cinética celular es compleja y puede abarcar desde magnitudes macroscópicas, como el **tiempo de doblamiento tumoral** (Td); hasta magnitudes celulares, como la **duración del ciclo celular** (Tc). Mientras que el Tc representa solo el aspecto reproductivo de la

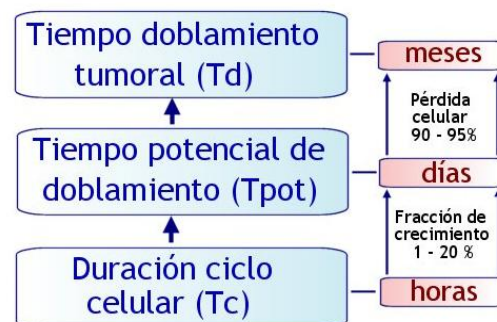


Figura 2: Relación de los diferentes parámetros de crecimiento celular.

población, el Td refleja el balance entre producción y pérdida celular. La **fracción de crecimiento** (FC) representa el porcentaje de células proliferantes presentes en un tumor. Aunque la FC debe ser tomada mas como un concepto que como una cantidad, oscila entre el 30-50%<sup>167</sup> en tumores experimentales; aunque en tumores humanos puede ser mucho más baja, del orden de 1-15%, debido a la presencia de células hipóxicas. El **factor de pérdida celular** (*cell loss factor*,  $\theta$ ), concepto acuñado por Steel<sup>168</sup>, representa la tasa de pérdida celular por inadecuada nutrición, apoptosis, ataque inmunológico, exfoliación y metástasis. Al igual que la FC es muy variable oscilando entre el 30-95%<sup>169</sup>. El **tiempo potencial de doblamiento** (Tpot), una medida intermedia entre el Tc y el Td, contempla la FC, pero no el factor de pérdida celular. Por tanto, los tres parámetros se hallan relacionados de la siguiente forma: el Tc es el tiempo que necesita una célula postmitótica para dividirse de nuevo; el Tpot incluye al Tc mas el efecto de una FC menor de 1; y el Td contempla, además, el efecto de la pérdida celular. Dicho de otro modo, el Tpot sería igual al Td si no existiera pérdida celular. Esta relación puede ser expresada matemáticamente como:

$$\theta = 1 - \frac{T_{pot}}{T_d} \quad T_{pot} = \frac{\ln 2 \times T_c}{\ln(1+Fc)}$$

Se asume que el Tpot es un buen parámetro de medida de la repoblación efectiva, por lo que su determinación pretratamiento podría identificar un subgrupo de pacientes con alto riesgo de recidiva local, en los cuales se deberían utilizar fraccionamientos acelerados que evitaran el problema de la repoblación tumoral. El método para la medida del Tpot fue descrita por Begg et al.<sup>170</sup> a partir de una biopsia tumoral tras la administración *in vivo* de Bromodeoxiuridina (BrdUrd). En un estudio experimental este mismo autor encontró el Tpot como una medida fiable de la tasa de repoblación tumoral.

## 1.3 Perfiles moleculares de respuesta

### 1.3.1 Concepto y técnicas generales

Los factores clínico-patológicos no son suficientes, en ocasiones, para definir adecuadamente el pronóstico de un paciente y la adecuación del tratamiento. Los factores clínicos relacionados con el huésped o con el tumor nos informan de la evolución de determinados grupos pronósticos; sin embargo, no son capaces de predecir la evolución de un paciente individualmente. Por este motivo, en las últimas décadas se han desarrollado técnicas que permiten evaluar las alteraciones moleculares de los tumores lo que nos proporcionará información pronóstica y, además, podremos utilizar tratamientos dirigidos a corregir dichas alteraciones. Ejemplos de estas terapias dirigidas son la utilización de cetuximab para bloquear el EGFR en cáncer de cabeza y cuello y colorectal; o el uso de antiangiogénicos en tumores con proliferación vascular. El desarrollo de estos tratamientos sigue una secuencia diferente a la de los citotóxicos convencionales. En primer lugar, se requiere el conocimiento del proceso y la identificación de la diana, con datos procedentes de la investigación básica o de estudios clínicos. Posteriormente se diseña el fármaco y se testa en estudios preclínicos y clínicos. Por ello, el conocimiento de los factores moleculares que intervienen en la génesis, desarrollo y agresividad de los tumores es importante.

En el cáncer de cérvix se conoce bien el papel que el HPV desempeña en la carcinogénesis y las alteraciones que produce a nivel molecular, especialmente en el control de la división celular en el punto de control previo a la fase S, discutidas más arriba. Sin embargo, solo un porcentaje de estas mujeres van a evolucionar a cáncer invasivo lo que implica que hay otras alteraciones que constituyen el segundo *hit* que completará el proceso de carcinogénesis. Estas alteraciones, además, tendrán un papel en la agresividad del tumor y la resistencia a diversos tratamientos.

En la clásica publicación de Hanahan y Weinberg<sup>171</sup>, se describen las 6 marcas distintivas del cáncer utilizadas por la célula tumoral para escapar al control del organismo. Estas son: autosuficiencia en las señales de proliferación, a través de la activación de receptores de membrana y la activación de vías de señalización celular;

insensibilidad frente a las señales antiproliferativas, como las mutaciones de pRb y el TGF $\beta$ ; capacidad de evadir la apoptosis, como la expresión aumentada de Bcl2 o la mutación de p53; potencial replicativo ilimitado, a través del mantenimiento de los telómeros; angiogénesis sostenida, con la activación del VEGF; e invasión tisular y metástasis. Muchos de los perfiles moleculares de respuesta evalúan factores implicados en estas características básicas de los tumores.

Algunos de estos mecanismos implicados en cáncer de cérvix son: ruta de señalización Wnt/Wingless, que induce acumulación citoplásmica de  $\beta$ -catenina cuyo exceso induce la transcripción a nivel nuclear de c-myc y ciclina-D; p16, producto de un gen supresor de tumores; p53, implicada en proliferación y apoptosis; Ki67, expresada en proliferación; EGFR, que activa la ruta de señalización del Ras-Raf-MAPK que activa genes de proliferación y supervivencia; y COX2, implicada en apoptosis y proliferación.

En cuanto a las técnicas de obtención de perfiles moleculares tumorales existe una gran variedad dependiendo del tipo de material que queramos determinar: DNA, RNA o proteína. La proteína es el resultado final de la expresión de un gen y, por ello, es más fiable a la hora de la elaboración de perfiles, aunque se pierde parte de información relevante. En general, las técnicas de biología molecular requieren tejido fresco manipulado en condiciones especiales por lo que la obtención de la muestra es más compleja. Sin embargo, la inmunohistoquímica se puede realizar en bloques de parafina y, en los últimos años, se han desarrollado técnicas para el análisis de DNA y RNA en cortes de tejido procedentes de bloques de parafina.

Las técnicas para la determinación de marcadores tumorales se basan en varias tecnologías básicas que se aplican en diversos ámbitos y que pueden combinarse entre ellas. Estas son la electroforesis en gel, que permite la separación de moléculas por su tamaño o carga eléctrica; hibridación, o unión de sondas a determinadas moléculas; el uso de anticuerpos, en inmunohistoquímica u otras técnicas; la *polimerase chain reaction* (PCR), para amplificar DNA; y los *microrrays*, que combinan algunas de las anteriores.

Para el estudio del DNA y RNA se usan el *Southern blot* (DNA), *Northern blot* (RNA), secuenciación, *fluorescence in situ hybridization* (FISH) y PCR. Las proteínas son detectadas mediante *Western blot*, IHQ, *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) o citometría de flujo.

### **1.3.2 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

El EGFR es un receptor de membrana que juega un papel fundamental en el comportamiento de las células epiteliales a través de la activación de vías de traducción de señal<sup>172</sup>. Pertenecce a una familia de receptores transmembrana de tirosin-quinasa conocida como familia c-erbB, que incluye 4 miembros: EGFR (HER1, c-erbB1), HER2 (c-erbB2), HER3 (c-erbB3) y HER4 (c-erbB4). El EGFR es una glicoproteína de 170 kd que comprende un dominio extracelular; una región transmembrana; y un dominio intracelular con actividad tirosín-quinasa. Tras la unión a sus ligandos, el epidermal growth factor (EGF) y el transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), forma un homodímero que también puede unirse a otros receptores de la familia c-erbB para formar heterodímeros activados. La dimerización del EGFR provoca la activación de la tirosín-quinasa intracelular provocando su autofosforilación y la activación de las vías de traducción de señal de mitogen-activated protein kinases (MAPK) y quinasas c-Jun N-terminal (JKN) que, finalmente, producen un fenotipo de proliferación, adhesión y migración celular<sup>172</sup>.

La expresión de EGFR se ha observado en el 25-72% de las pacientes con cáncer de cérvix<sup>97,98,173-176</sup>. En diversos trabajos se ha mostrado que la expresión de EGFR se correlaciona con una peor supervivencia<sup>96,97,173,174,176</sup>, supervivencia libre de enfermedad<sup>174</sup> y recidiva<sup>97</sup>. En varios estudios el valor pronóstico se mantuvo en el análisis multivariante con un HR de 2.5 a 3.53<sup>96,174,175,177</sup>.

Otros estudios, sin embargo, no han encontrado correlación entre la expresión de EGFR y el control de la enfermedad<sup>178,179,180</sup>.

Los resultados no definitivos descritos en la literatura respecto al valor pronóstico de la expresión de EGFR en cáncer de cérvix pueden explicarse por la heterogeneidad en las



series y los diferentes tratamientos y, sobre todo, a las diferentes técnicas de inmunohistoquímica empleadas y los diferentes puntos de corte empleados.

### **1.3.3 Antígeno ki67**

La proteína nuclear Ki67 o MKI67, codificada por el gen MKI67, es necesaria para la división celular a través de su interacción con la transcripción ribosomal del RNA<sup>181</sup>. El Ki67 es un marcador de proliferación cuya expresión se produce durante todas las fases activas del ciclo celular como G1, S, G2 y M; mientras que está ausente en la fase G0. Durante la interfase está localizado en el núcleo y durante la mitosis se recoloca en la superficie de los cromosomas<sup>182</sup>. Estas características lo hacen idóneo para la determinación de la fracción de crecimiento de un tumor, llamada por algunos autores *Ki67 labelling index*, la cual ha demostrado su utilidad como marcador de agresividad clínica en diversos tumores, como linfoma, mama o próstata.

La determinación de Ki67 se ha utilizado en la evaluación de la progresión del tejido displásico y CIN<sup>183,184</sup>. Sin embargo, el valor pronóstico de la determinación de la actividad proliferativa mediante el Ki67 es controvertida.

El Ki67 puede ser detectado mediante anticuerpos cualitativa o cuantitativamente por diversos métodos como IHQ, microscopia electrónica, ELISA, citometría de flujo e inmunocitoquímica. En la evaluación por IHQ se evalúan habitualmente el porcentaje de células positivas.

En cuanto a la correlación con el pronóstico, en general los estudios reportan un peor control de la enfermedad en pacientes con altos niveles de Ki67<sup>64,185,186</sup> pero otros autores encuentran lo contrario<sup>187-189</sup> o no ven correlación<sup>190</sup>. Un metaanálisis parece confirmar el valor pronóstico negativo del Ki67 ya que muestra un riesgo de muerte del 1.63 en pacientes con altos índices de Ki67, aunque este factor no alcanzó significación estadística para supervivencia libre de enfermedad<sup>191</sup>.

### **1.3.4 Proteína supresora de tumores p53**

El gen p53 está localizado en el cromosoma 17 y codifica una proteína de 53 kDa. La p53 es un factor de transcripción que se activa tras un daño genómico y produce una

parada del ciclo celular en la fase G0G1 durante la cual la célula tiene la oportunidad de reparar el daño o inducir la apoptosis, en caso de daño irreparable<sup>192</sup>.

En tejido cervical normal o lesiones preinvasivas la frecuencia de positividad de la p53 está alrededor del 25%, incrementándose hasta el 58% en el carcinoma invasivo<sup>193</sup>, lo que sugiere una participación del p53 en el proceso de carcinogénesis. La expresión de p53 se asocia con positividad del antígeno de proliferación Ki67 ( $p=0.021$ )<sup>194</sup>, indicando un incremento de la proliferación.

En la gran mayoría de las series de pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia se ha objetivado una peor supervivencia en los casos con positividad de la p53<sup>193,195,196</sup>, resultados que parecen confirmarse en un metaanálisis que muestra un riesgo de muerte de 1.67 en pacientes con p53+<sup>197</sup>. Otros estudios, sin embargo, no encuentran valor pronóstico ni en pacientes tratadas con radioterapia<sup>180,198</sup> ni con cirugía<sup>194</sup>.

### **1.3.5 Ciclo-oxigenasa-2 (COX2)**

La familia de ciclooxigenasas (COX) son enzimas que sintetizan una serie de prostaglandinas implicadas en inflamación y otros procesos celulares. Hay 2 isoformas: la COX1, que se expresa de forma constitutiva en todas las células y genera prostaglandinas para funciones normales de la célula; y la COX2, inducible frente a estímulos como promotores tumorales, citoquinas, daño celular y otros<sup>199</sup>. La COX2 se encuentra sobreexpresada en diversos tumores y se ha implicado en carcinogénesis y proliferación tumoral<sup>200</sup>. Dentro de los posibles mecanismos para la potenciación del crecimiento tumoral por parte de la COX2 están la mitogénesis, pérdida de adhesión celular, empeoramiento del sistema inmune, inhibición de la apoptosis y aumento angiogénesis<sup>201</sup>.

Los estudios publicados acerca del valor pronóstico de la expresión de COX2 en cáncer de cérvix muestran que la positividad de COX2 se relaciona con una peor supervivencia<sup>96,103,202-205</sup>; menor respuesta tumoral<sup>102,206</sup>; mayor recidiva<sup>173,202,203,206</sup>; y mayor diseminación a distancia<sup>207</sup>. Uno de estos estudios no mostró relación de la COX2 con la supervivencia<sup>206</sup>. La expresión de COX2 se ha descrito más

frecuentemente en la histología de adenocarcinoma<sup>102,104</sup> y se ha asociado a factores de mal pronóstico<sup>104,204</sup>.

El mal pronóstico de la positividad de COX2 se ha confirmado en un metaanálisis<sup>208</sup> en el que existe mayor riesgo de muerte (HR: 2.53) y menor respuesta clínica (HR:3.03) en este grupo de pacientes.

### **1.3.6 Gen supresor de tumores p16**

El progreso de las células a través del ciclo celular está gobernada por unos complejos proteicos compuestos de una ciclina unida a una quinasa dependiente de ciclina (*cyclin-dependent kinase*, CDK). Existen diversos tipos de complejos ciclina-cdk que actúan a diferentes niveles del ciclo celular<sup>209</sup>. En la transición de la fase G1 a la fase S intervienen las Ciclina D / CDK4, Ciclina D / CDK6, y Ciclina E / CDK2; mientras que la fase S está controlada por la Ciclina A / CDK2. El otro punto de control del ciclo celular, situado en la transición a la fase G2 y la mitosis, se encuentra bajo control de la Ciclina B / CDK1<sup>209</sup>.

Uno de los factores que intervienen en la división celular es la proteína supresora de tumores del retinoblastoma (pRb), la cual se une al factor de transcripción E2F, impidiendo el paso a la fase S. Los complejos Ciclina D / CDK4,6 provocan la fosforilación de la pRb liberando el factor E2F que produce la transcripción de genes que inducen la progresión a fase S. Al mismo tiempo existen inhibidores de CDKs que se pueden dividir en dos familias: la denominada Cip/Kip que inhibe los complejos Ciclina A,E /CDK2, que incluye p21, p27 y p57; y la familia INK4 que actúan sobre la Ciclina D / CDK4,6. Estos compuestos se consideran proteínas supresoras de tumores y la pérdida de su función puede dar lugar a transformación maligna o agresividad.

La p16 es una proteína supresora de tumores codificada por el gen CDKN2A que interviene en la regulación del ciclo celular por su participación en la vía p16 - Ciclina D / CDK4,6 – pRb. Está implicada en carcinogénesis de diversos tumores, progresión tumoral y senescencia<sup>210</sup>. La unión de la proteína E7 a la pRB produce un aumento de la p16 convirtiéndola en un marcador subrogado de la infección por HPV<sup>211</sup>(Figura 1).

En un trabajo se encontró que la positividad de p16 fué menor del 10% en el epitelio normal, incrementándose al 72% en CINI y al 100% en CINII-III y carcinoma invasivo<sup>212</sup>. También se ha encontrado expresión de p16 en adenocarcinoma en un porcentaje de pacientes entre el 52-100%<sup>212-214</sup>.

La expresión de p16 combinada con la determinación de DNA HPV ha sido propuesta para distinguir los adenocarcinomas de endocérnix de los de endometrio ya que los primeros presentan una p16 positiva en el 95% de los casos y un DNA HPV en el 75% de las muestras; mientras que las cifras correspondientes a los segundos son del 36% y 0%, respectivamente<sup>215</sup>. En otro estudio<sup>216</sup> la determinación de p16 para diferenciar entre adenocarcinoma de cérnix y endometrio mostró una sensibilidad, especificidad y precisión del 71.4%, 87.5% y 81.6%, respectivamente.

La p16 se ha utilizado como marcador pronóstico en pacientes con cáncer de cérnix. Este factor se asocia consistentemente con una peor supervivencia en diversas series<sup>193,217-219</sup> y con un mayor riesgo de muerte en un metaanálisis (RR: 0.6)<sup>220</sup>.

### ***1.3.7 Oxigenación tumoral***

Clásicamente se ha reconocido que la presencia de células hipóxicas en un tumor es un factor que contribuye a su radioresistencia<sup>221</sup>. La evidencia de este hecho procede, en su mayor parte, de modelos experimentales; y, por inferencia, este concepto se ha aplicado a los tumores humanos. Desde la publicación de estudios histológicos en cáncer de cérnix que demostraban la relación entre el control local y distancia intercapilar<sup>222</sup> o densidad vascular tumoral<sup>223</sup>, se han realizado esfuerzos para medir la fracción de células hipóxicas en tumores humanos. Sin embargo, la hipoxia tumoral y su papel en la respuesta tumoral a la irradiación es poco conocida. Ello es debido en parte a la ausencia de métodos probados que puedan ser aplicados de forma rutinaria para la medición de la hipoxia tumoral en pacientes tratados con radioterapia. Por otro lado, diversos estudios en los que se han utilizado medios para contrarrestar la hipoxia han dado resultados negativos<sup>224-226</sup>, lo cual ha puesto en duda la utilidad de la medición del status de oxigenación tumoral.

Aunque los métodos para la medición de la hipoxia tumoral son múltiples, en una reunión de expertos<sup>227</sup> se han recomendado dos métodos para la evaluación clínica de la hipoxia: el método polarográfico, mediante la inserción de microelectrodos intratumorales que miden la  $pO_2$ <sup>228-230</sup>; y los ensayos con nitroimidazoles ligados a radioisótopos, que actúan como marcadores de células hipóxicas, en combinación con tomografía por emisión de positrones (*positron emission tomography*, PET)<sup>231</sup>.

La medición directa de la oxigenación mediante sondas se estudió durante los años 90 y principios de los 2000, siendo sustituida gradualmente por el PET, prueba no invasiva, aunque diversos estudios demostraron el valor pronóstico de la  $pO_2$  intratumoral<sup>232-234</sup>. En un estudio<sup>233</sup>, las pacientes con tumores hipóxicos ( $<10$  mm Hg) medidos mediante sonda polarográfica tuvieron un riesgo aumentado de muerte (OR: 3,05;  $p=0.0039$ ). El mismo autor en otro trabajo<sup>234</sup> demuestra una menor  $pO_2$  intratumoral en pacientes con tumores recurrentes frente a los primarios ( $pO_2 < 10$  mm Hg de 7,1 frente a 12,1, respectivamente;  $p=0.0013$ ), además de objetivar una peor supervivencia y mayor diseminación a distancia en los tumores hipóxicos.

En pacientes con cáncer de cérvix se ha objetivado que los tumores hipóxicos, evidenciados por una alta captación en un  $^{18}F$ -FETNIM PET/CT, tuvieron una peor supervivencia global ( $p=0.02$ ) y libre de progresión ( $p=0.002$ )<sup>235</sup>. Estos mismos resultados fueron obtenidos por Dehdashti et al.<sup>236</sup> quienes encuentran una supervivencia libre de progresión a 3 años del 71% frente al 28%, para tumores normóxicos e hipóxicos, respectivamente ( $p=0.01$ ),

La angiogénesis es un proceso dinámico que resulta difícil de evaluar en el ámbito clínico. Como se ha mencionado mas arriba, la realización de pruebas de imagen, como PET o RMN, combinadas con marcadores de hipoxia es una alternativa que tiene en cuenta la faceta dinámica pero no informa de lo sucedido a nivel microscópico. Un método directo, realizado en muestras tumorales de la paciente, es la determinación de la densidad intratumotal de microvasos (*intratumoral microvessels density*, IMVD).

La determinación de la IMVD en muestras tumorales tiene las ventajas de evaluar la angiogénesis a nivel tisular y la disponibilidad de muestras para su estudio. Diversos

trabajos han demostrado una relación directa entre la IMVD y la expresión de *vascular endothelial growth factor* (VEGF)<sup>237,238</sup>. Se ha demostrado una correlación significativa entre la IMVD y la expresión de mRNA del factor angiogénico de permeabilidad vascular<sup>239</sup>. En pacientes con cáncer de endometrio también se ha demostrado una correlación entre expresión de VEGF, angiogénesis y mal pronóstico<sup>240</sup>.

En cuanto a la correlación entre pruebas de imagen, como RMN o PET, y la IMVD hay datos en estudios preclínicos que muestran una relación entre el volumen capilar estimado por RMN y la densidad microcapilar estimada mediante tinción contra el Factor VIII-related-antigen (FVIII-RA) en tumores murinos<sup>241</sup>. Sin embargo, en un estudio clínico en pacientes con cáncer de cérvix, no se encontró correlación entre la IMVD y la medida de la hipoxia con RMN, utilizando el parámetro de incremento de señal tras la administración de contraste<sup>242</sup>. En este mismo estudio, los valores medios de la pO<sub>2</sub>, medida mediante sonda polarográfica, tuvieron una correlación significativa con la RMN<sup>242</sup>.

Aunque estudios sobre diversos tumores han demostrado el valor pronóstico de la IMVD, otros no encuentran relación entre esta y el resultado del tratamiento. Estas discrepancias pueden ser debidas a las diferentes técnicas empleadas; la elección del marcador específico, CD31, CD105 o FVIII-RA; el punto de corte para el análisis; y la experiencia del observador. En un estudio se comprobó que la técnica de tinción y diferentes observadores modificaron sustancialmente los valores de IMVD<sup>243</sup>. Para soslayar estos problemas se han elaborado estándares por grupos internacionales<sup>244</sup>. El método más común para la evaluación de la IMVD en muestras histológicas es la tinción con anticuerpos contra antígenos endoteliales entre los que se encuentran CD31, CD34, CD105 y FVIII-RA. En muestras parafinadas el CD31, un marcador panendotelial, es el más utilizado. El CD34 también se ha utilizado ampliamente pero puede estar presente también en linfáticos y espacio perivascular. En dos estudios de cáncer de mama<sup>245</sup> y pulmón<sup>246</sup>, el CD105 fue superior al CD31 en la determinación de la IMVD.

El papel de la determinación de la IMVD como factor pronóstico en cáncer de cérvix no ha sido claramente establecido debido a la disparidad de resultados y la escasez de estudios. Si bien en diversos tipos de cánceres parece existir valor pronóstico de la IMVD<sup>247</sup>, en cáncer de cérvix hay muy pocos trabajos siendo dos de ellos negativos<sup>248,249</sup>; mientras que otro encontró un peor pronóstico en pacientes con una IMVD  $\geq 128$  mv<sup>68</sup>.

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Los factores clínicos relacionados con el huésped o las características tumorales sirven para separar a las pacientes con cáncer de cérvix en grupos pronósticos pero no permiten la predicción de la respuesta individual de una paciente. Por ello hemos planteado el estudio de métodos que permitan predecir la respuesta al tratamiento radioterápico de forma independiente a los factores pronósticos clásicos. Entre ellos se encuentran los ensayos predictivos de respuesta y los perfiles moleculares de respuesta.

Los denominados ensayos predictivos de respuesta parten de la hipótesis de que las células procedentes del tumor conservan las características biológicas del tumor de origen por lo que el estudio en el laboratorio de su radiosensibilidad o capacidad proliferativa se correlacionaría con la respuesta clínica de la paciente.

Las alteraciones moleculares en determinados genes relacionadas con la reparación, proliferación y metástasis permiten la elaboración de perfiles moleculares de respuesta a la radioterapia. Se parte de la hipótesis de que determinadas alteraciones moleculares determinadas en muestras tumorales de la paciente se correlacionarán con el control de la enfermedad.



### 3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

- Determinar la correlación entre la expresión de EGFR, Ki67, COX2, p53 y p16 con la supervivencia y recidiva y elaborar un patrón molecular de respuesta a la radioterapia.
- Describir la correlación de los parámetros moleculares con otros factores clínicos
- Establecer la existencia de un patrón molecular distintivo presente en el adenocarcinoma y sus variantes histológicas.
- Determinar la correlación entre la vascularización tumoral, medida mediante la densidad intratumoral de microvasos (IMVD), con la supervivencia y recidiva; así como con los niveles de Hb.
- Determinar la correlación entre la fracción superviviente a 2 Gy y el Tpot, determinados en muestras tumorales de las pacientes, y la supervivencia y recidiva.
- Establecer la validez del sistema CAM para el cultivo primario de células tumorales.
- Evaluar la influencia de los factores pronósticos clínicos en la supervivencia y recidiva.

## 4. PACIENTES Y MÉTODOS

### 4.1 Estudio clínico

#### *4.1.1 Inclusión de pacientes y recogida de datos*

El estudio se ha realizado en 136 pacientes diagnosticadas de cáncer de cérvix estadios avanzados (FIGO IIA – IVA) tratadas con radioterapia radical y braquiterapia en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Puerta de Hierro entre los años 1991 y 2000.

Los criterios de inclusión de pacientes en el estudio fueron:

- Diagnóstico histológico de carcinoma de cérvix.
- Tratamiento radical con radioterapia externa combinada o no con braquiterapia endocavitaria.
- Ausencia de tratamiento quimioterápico concomitante.
- Pacientes con estadios IIA, IIB, IIIA, IIIB y IVA de la FIGO (edición de 1995).

Durante el período del estudio fueron vistas en el servicio 375 pacientes diagnosticadas de cáncer de cérvix, de las cuales 136 pacientes cumplían los criterios de inclusión. El resto de las pacientes fueron excluidas por alguna de las siguientes causas: irradiación postoperatoria; estadios precoces; tratamiento paliativo; tumores de histología no epitelial; y otras diversas.

La elección del periodo de estudio se hizo en base a que a partir del año 1991 se realizó sistemáticamente una dosimetría mediante placas radiográficas con cálculo de dosis en puntos A, recto y vejiga, entre otros; lo cual permite un estudio más preciso de las dosis administradas para su correlación con control local, supervivencia y toxicidad. Dado que el estudio se comenzó en 2002 en cuyo momento había pocas pacientes tratadas con radioquimioterapia, tratamiento estándar actualmente, se decidió incluir solo a pacientes sin quimioterapia concomitante con objeto de homogeneizar la serie.

Para la recogida de los datos se han revisado las historias clínicas de los pacientes, así como toda la documentación dosimétrica disponible, diseñándose un cuestionario en el que se recogieron las siguientes variables clínicas para su análisis:

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| - Edad                             | - Dosis radioterapia                                |
| - Cirugía abdominal previa         | - Fraccionamiento                                   |
| - Niveles de Hb                    | - Intervalo braquiterapia                           |
| - Valor de creatinina sérica       | - Tipo braquiterapia                                |
| - Estadio clínico                  | - Tasa dosis  |
| - Número de parametrios<br>afectos | - Tiempo total tratamiento                          |
| - Afectación inferior de<br>vagina | - Dosis y tasa rectal                               |
| - Presencia de Hidronefrosis       | - Dosis y tasa vesical                              |
| - Afectación ganglios pélvicos     | - Existencia recidiva local,<br>pélvica o distancia |
| - Tamaño tumoral                   | - Tiempo a recidiva                                 |
| - Morfología tumoral               | - Supervivencia                                     |
| - Subtipo histológico              | - Existencia toxicidad                              |
| - Grado histológico                | - Tiempo toxicidad                                  |
| - Morfología tumoral               | - Tiempo de seguimiento                             |

No se pudo recoger como variable el estado de desempeño (escalas de Karnofsky o ECOG) de las paciente debido a que este dato no estaba recogido de forma fiable en todas las historias clínicas.

En todas las pacientes se realizó re-estadiaje de acuerdo a la clasificación de la FIGO de 1995. Esta clasificación es completamente superponible a la de 2009, actualmente vigente, en lo que respecta a los estadios IIA-IVA.

Existen diversas escalas para la medición de la toxicidad por radioterapia en pacientes con cáncer ginecológico. Dentro de las más usadas se encuentran la escala del *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG), la denominada *Late Effect Normal Tissues – Subjective, Objective, Management, Analytic* (LENT-SOMA) y el *Common Toxicity Criteria for Adverse Effects* (CTCAE). La escala CTCAE, la más utilizada actualmente, no estaba desarrollada cuando se trataron las pacientes. El sistema LENT-SOMA es muy completa pero su complejidad hace que solo pueda ser usada de manera prospectiva. Dado que en las historias clínicas revisadas para esta tesis la toxicidad está referida de una forma descriptiva, añadiendo el grado RTOG en ocasiones, se ha optado por

utilizar el *French Italian Glossary* (FIG) que describe con detalle las potenciales toxicidades y que es más adecuada para estudios retrospectivos.

La escala FIG<sup>132</sup>, presentada en 1988, permite la identificación precisa de cada complicación, mediante la identificación del órgano que la sufre y el grado de la misma. El glosario contempla 5 grados de severidad creciente (de 0 a 5) que pueden afectar a 14 órganos o tejidos sanos. Consta de un sistema de gradación general que incluye las 5 categorías: G0, no toxicidad; G1, leve; G2, moderada; G3, severa; y G4, muerte. Una segunda parte describe detalladamente las toxicidades que corresponden a cada grado en 14 órganos o tejidos, añadiendo un sufijo (a-e) para subclasificación: recto, colon, intestino delgado, estómago, duodeno, vejiga, uréter, vascular, cutáneo, útero-vulva-vagina, tejidos blandos pélvicos, hueso, nervio periférico y sistema hematopoyético<sup>132</sup>. Aunque el sistema permite también la evaluación de la toxicidad aguda, en el presente trabajo se han utilizado exclusivamente los ítems correspondientes a toxicidad tardía. Se consideraron como toxicidad tardía mayor las complicaciones grados G2-G4

Todas las pacientes antes del tratamiento firmaron un consentimiento informado que incluía la autorización para la publicación de los datos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del H. Puerta de Hierro.

#### ***4.1.2 Características de los pacientes***

Las características clínicas de las pacientes se muestran en la Tabla IV.

La edad media y mediana fue de 61 (25-90) y 62 años, respectivamente. Doce pacientes (9%) presentaron una edad inferior a 40 años.

Cuarenta pacientes (29%) presentaban como antecedente algún tipo de intervención quirúrgica abdominal.

En 112 pacientes se dispuso de las cifras de hemoglobina (Hb) previas al tratamiento radioterápico. Las cifras de Hb al finalizar el tratamiento se determinaron en 53 pacientes. En 53 pacientes se dispuso, al menos, de 2 determinaciones de hemoglobina durante el tratamiento que permitieron calcular la variación de la misma. Las pacientes

Tabla IV: Características clínicas de la serie completa (n=136)

	n (%)
<b>Edad media</b>	61 años (25-90)
<b>Hb media</b>	12.6 gr/dl
<b>Hidronefrosis</b>	
No	117 (86%)
Sí	19 (14%)
<b>Estadio</b>	
IIA	6 (4%)
IIB	54 (40%)
IIIA	5 (4%)
IIIB	58 (43%)
IVA	13 (10%)
<b>Ganglios pélvicos</b>	
N0	123 (90%)
N+	13 (10%)
<b>Afectación parametrial</b>	128 (94%)
<b>Afectación vaginal</b>	79 (58%)
<b>Morfología</b>	
Exofítico	87 (64%)
Ulcerado	29 (21%)
Mixto	12 (9%)
Endocervical	8 (6%)
<b>Histología</b>	
Epidermoide	118 (87%)
Adenocarcinoma NOS	12 (9%)
Células claras	3 (2%)
Adenoescamoso	2 (2%)
<i>Glassy cell</i>	1 (1%)

se estratificaron en 2 grupos de acuerdo a su nivel de Hb para el análisis estadístico: menor o igual y mayor de 12 gr/dl.

Hidronefrosis de cualquier grado evaluada mediante urografía intravenosa, ECO o TAC, se objetivó en 19 pacientes (14%). Los niveles de creatinina (Cr) previos al tratamiento fueron obtenidos en 110 pacientes. Los niveles medios y mediana de Cr fueron 1.2 mg/100 ml (0.5-17.4) y 0.9 mg/100 ml. Para el análisis se consideró la

existencia de insuficiencia renal con niveles superiores a 1,2 mg/100 ml, situación que se objetivó en 14 pacientes (13%).

La distribución por estadios fue como sigue: IIA : 6 p.; IIB: 54 p.; IIIA: 5 p.; IIIB: 58 p.; y IVA: 13 pacientes. La existencia de afectación ganglionar pélvica al diagnóstico, determinada mediante ECO, TAC abdominopélvico o exploración quirúrgica, se objetivó en 13 pacientes (10%). Afectación parametrial se objetivó en 128 pacientes (94%), siendo unilateral en 62 pacientes y bilateral en 66 pacientes. Setenta y nueve pacientes (58%) presentaron afectación vaginal. La infiltración tumoral de los tercios superior, medio e inferior vaginales se presentó en 36, 27 y 16 pacientes, respectivamente. En 12 pacientes (8,8%) existió infiltración de mucosa vesical.

En 131 pacientes se realizó una estimación del tamaño tumoral en base a los datos de la exploración ginecológica. Cuando existía afectación parametrial y/o de vagina, ésta se incluyó en el cálculo del tamaño tumoral. El tamaño tumoral medio y mediano fue de 7,4 cm (2 - 15) y 7 cm, respectivamente. Se estratificó en 2 grupos para el análisis estadístico: tumores igual o menores de 4 cm. (24 pacientes) y mayores de 4 cm (107 pacientes).

En cuanto al subtipo histológico, la mayor parte de los tumores fueron epidermoides (118 p., 87%). La anatomía patológica del resto fue adenocarcinoma NOS en 12 p.; células claras en 3 p.; adenoescamoso en 2 p.; y *Glassy cell* en 1 p.

Solo se dispuso de información acerca del grado histológico en 62 pacientes. Dentro de estas pacientes, el tumor se clasificó como grados 1, 2 ó 3 en 10 (16%), 30 (48%) y 22 pacientes (35%), respectivamente.

En base a las descripciones recogidas en la historia clínica el aspecto morfológico del tumor se clasificó en 4 grupos: exofítico; ulcerado; mixto; y endocervical. El número de casos en cada uno de estos patrones fue de 87, 29, 12, y 8 pacientes, respectivamente.

#### ***4.1.3 Características del tratamiento***

**Irradiación externa:** todas las pacientes fueron tratadas con megavoltaje: fotones de Cobalto o fotones de 15 Mv generados por Acelerador Lineal. En casi todos los casos

las pacientes fueron tratadas mediante 2 campos paralelos y opuestos, anteroposterior y posteroanterior. En 8 casos se utilizó una técnica de ciclopendulaciones, mediante campos rotacionales en una unidad de Cobalto.

En 126 pacientes (92%) se realizó el tratamiento sobre un volumen pélvico. Las regiones inguinales fueron incluidas en 8 pacientes y en las 2 pacientes restantes se amplió el volumen de irradiación para incluir los ganglios lumboaórtico. Los límites del campo pélvico fueron muy homogéneos en toda la serie y se describen a continuación:

Límite superior: Espacio entre L4-L5 ó L5-S1.

Límite inferior: Un centímetro por debajo de los agujeros obturadores en caso de no existir afectación de tercios medio o inferior vaginales. En caso de afectación vaginal, se cubrió toda la extensión tumoral usando marcadores radiopacos en la simulación.

Límites laterales: 1,5 centímetros por fuera de la pelvis ósea.

En todos los casos se utilizó un fraccionamiento convencional de 180 ó 200 cGy/día.

La dosis media y mediana administradas a la pelvis fueron de 49.2 Gy (44 – 52,5) y 50.4 Gy, respectivamente.

En 30 pacientes se realizó sobredosificación de una o ambas regiones parametriales, tras la realización de la braquiterapia endocavitaria, usando 2 campos, anteroposterior y posteroanterior, con protección de línea media. La dosis media administrada en la sobredosificación en estos pacientes fue de 7.7 Gy (3,6-12).

En 6 pacientes, en las que no pudo realizarse el tratamiento con braquiterapia por dificultades técnicas o porque no se consideró adecuado, se completó el tratamiento con irradiación externa utilizando campos anterior y posterior, o bien, laterales. Una paciente adicional, en la que no pudo introducirse la sonda intrauterina, recibió sobredosificación con irradiación externa y además se realizó una aplicación con colpostato de Fletcher. En estas 7 pacientes, la dosis media total administrada sobre el tumor fue de 64.3 Gy (60-68).

**Braquiterapia:** el tratamiento braquiterápico se realizó en todos los casos con sistemas de baja tasa (LDR). A las 2 semanas de finalización del tratamiento con radioterapia externa se realizaron 1 ó 2 implantes consistentes en colpostato de Fletcher mas sonda intrauterina cargados con fuentes de  $^{137}\text{Cs}$ . En los casos con afectación de tercios medio o inferior de vagina se utilizaron cilindros vaginales en lugar de colpostato de Fletcher.

Se realizó braquiterapia en 130 pacientes. En cuanto a los tipos de aplicación realizadas fueron las siguientes: SIU mas colpostato de Fletcher en 92 pacientes; SIU mas cilindros vaginales en 21 pacientes; y combinación de SIU, colpostato de Fletcher y cilindros vaginales en 15 pacientes. En una paciente, con un estadio IIB, se realizó una sola aplicación con colpostato de Fletcher, debido a imposibilidad de insertar la SIU en canal endocervical. Esta paciente recibió, asimismo, sobredosificación con irradiación externa.

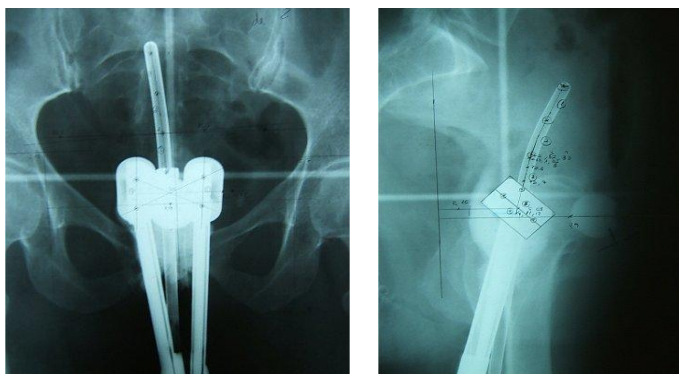
El intervalo medio entre el final de la radioterapia externa y el implante fue de 14 d. (3-48). En 44 pacientes (32%) este intervalo fue mayor de 14 días. En la mayoría de los casos la braquiterapia se realizó en 2 tiempos excepto en 21 pacientes (16%) en que se realizó una sola aplicación.

En todas las pacientes se realizó dosimetría con 2 placas radiográficas ortogonales, posteroanterior y lateral, en el simulador con una magnificación de 1,5. En ellas se dibujaron los extremos de las fuentes, así como los siguientes 10 puntos de referencia: puntos A, B y P derechos e izquierdos; punto de superficie vaginal y a 0,5 cm. de la misma; punto rectal; y punto vesical. Las fuentes se dibujaron a lo largo de la SIU y en medio de cada mitad del colpostato de Fletcher, en la placa lateral, trasladándose después a la placa posteroanterior (Figura 3). Para el dibujo de los puntos de referencia se usaron las siguientes definiciones:

Puntos A: Siguiendo el eje de la sonda intrauterina, 2 cm en dirección craneal, desde el tornillo tope de la SIU a nivel del OCE, y 2 cm en la dirección lateral correspondiente, derecha o izquierda. Estos puntos se dibujan en la placa posteroanterior, para ser posteriormente trasladados a la placa lateral sobre el eje de la SIU. Corresponde al triangulo paracervical, en el borde medial del ligamento ancho donde los vasos



Figura 3: placas radiográficas ortogonales utilizadas para la realización de la dosimetría de la braquiterapia



uterinos se cruzan con el uréter. Proporciona una estimación de la dosis que reciben los parametrios proximales.

Puntos B: Siguiendo el eje de la paciente; 2 cm en dirección craneal, desde el tornillo tope de la SIU; y 5 cm en la dirección lateral correspondiente, derecha o izquierda. Estos puntos se dibujan en la placa posteroanterior, para ser posteriormente trasladados a la placa lateral sobre el eje de la SIU. Estima la dosis en ganglios obturadores y parametrios distales.

Puntos P: Intersección de dos líneas, en ángulo recto, que pasan por el aspecto superior e interno de la cavidad acetabular. Estos puntos se dibujan en la placa posteroanterior, para ser posteriormente trasladados a la placa lateral sobre el eje de la SIU. Estima la dosis en ganglios ilíacos externos.

Puntos de superficie vaginal y a 0,5 cm: Situado en la superficie del colpostato de Fletcher, en su parte media, y a 0.5 cm. del mismo. Estos puntos se dibujan en la placa posteroanterior, para ser posteriormente trasladados a la placa lateral, en la que coinciden con el centro de los colpostatos de Fletcher.

En el caso de utilización de cilindros vaginales se dibujan varios puntos en la superficie de los mismos y a 0,5 cm., habitualmente a nivel de cúpula, tercio superior, medio e inferior de vagina. Se dibujan en la placa lateral y se trasladan a la placa posteroanterior en el eje de la sonda.

Punto rectal: En un eje que pasa por el punto central de los colpostatos de Fletcher, en dirección posterior, a una distancia de 0.5 cm de la superficie de los colpostatos o en la parte mas posterior de la gasa radiopaca. Este punto se dibuja en la placa lateral y se traslada a la placa posteroanterior, donde coincide con el punto central de los 2 colpostatos de Fletcher.

Punto vesical: parte más anterior y medial, en sentido cráneo-caudal, del globo de la sonda vesical, relleno con contraste radiopaco. Este punto se dibuja en la placa lateral y posteriormente se traslada a la placa posteroanterior, o se dibuja directamente en ella en caso de que se visualice bien el globo de la sonda vesical.

En general, la prescripción de la dosis a administrar con braquiterapia se realiza en los puntos A, que corresponde a la parte media de la región parametrial. Aunque existieron unos criterios generales acerca de la dosis a administrar en cada estadio, se realizó un análisis individualizado en cada caso. Las dosis de prescripción generales, una vez sumada la dosis con irradiación externa, según estadios fueron:

Estadio II: 8500 - 9000 cGy

Estadio III: 9000 - 9500 cGy

Estadio IV: 8500 - 9500

Estas dosis se modificaron para mantenerse por debajo de las dosis de tolerancia de los órganos sanos: recto y vejiga. Las dosis máximas aceptadas, sumando la irradiación externa, en punto rectal y vesical fueron de 7000 -7500 cGy y 7500 - 8000 cGy, respectivamente. Estas dosis máximas fueron sobrepasadas en algunas pacientes, en base a la situación de la enfermedad y criterios clínicos.

En pacientes en las que se utilizaron cilindros para cubrir enfermedad vaginal, se tomó en consideración a la hora de la prescripción, no solo la dosis en puntos A, sino también la dosis en superficie y a 0.5 cm. de vagina, para alcanzar dosis adecuadas en las zonas de enfermedad macroscópica.

Incluyendo la dosis de irradiación pélvica, las dosis totales medias en puntos A, B y 0.5 cm. de superficie fueron de 81 Gy (59.3-91.9), 58.5 Gy (48.8-68) y 78.6 Gy (59.9-106.6),

respectivamente. Las dosis totales medias para recto y vejiga fueron 70.7 Gy (60-83) y 75.1 Gy (57-106), respectivamente.

**Tasa de dosis:** con objeto de analizar el impacto de la tasa de dosis a nivel de control tumoral y complicaciones se calculó la misma dividiendo la media de las dosis totales recibidas con braquiterapia a nivel de puntos A derecho e izquierdo, recto y vejiga entre la suma de los tiempos de duración de cada aplicación. La tasa media y la mediana en puntos A fué de 0.8 Gy/h (0.12-1.2) y 0.81 Gy/h.

El **tiempo total de tratamiento** (*overall treatment time*, OTT) fue definido como el tiempo transcurrido desde el inicio de la irradiación externa hasta la finalización de la braquiterapia y, por tanto, incluye la duración de la radioterapia, el intervalo hasta el implante y la duración del implante. El OTT medio y mediano fue de 57.2 d.(54-96.7) y 56.7 d., respectivamente.

## **4.2 Ensayos predictivos de respuesta**

### **4.2.1 Pacientes y características clínicas**

Entre Enero de 1995 y Diciembre de 1997 se incluyeron 15 de las 136 pacientes en el estudio de ensayos predictivos de respuesta para la determinación pretratamiento de la fracción superviviente a 2 Gy (FS2) y tiempo potencial de doblamiento (Tpot) en muestras tumorales.

Características clínicas:

Edad media: 63 años (25-86)

Estadio FIGO: II: 7 p. (47%); III: 8 p. (53%)

Epidermoide: 13 p. (80%); Adenocarcinoma: 3 p. (20%)

Grado histológico: G1: 4 p. (27%); G2: 8 p. (53%); G.: 3 p. (20%)

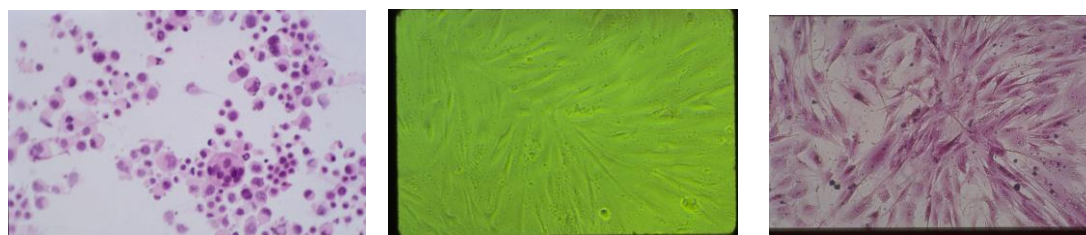
El proyecto fue financiado por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social (FIS 93/0667 y FIS 93/5298). Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado, autorizando la infusión de BrdUrd y la toma de biopsia, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del H. Puerta de Hierro.

#### 4.2.2 Metodología de los ensayos predictivos

A las pacientes se les administró una dosis única de Bromodeoxiuridina (BrdUrd, 250 mg, IV, en bolus), realizándose biopsia de la tumoración 3-6 h. más tarde. Cada biopsia se dividió en dos partes: una para citometría de flujo y la otra para cultivo.

**Medición de la radiosensibilidad intrínseca** (Figura 4): Para el cultivo de células tumorales se utilizó el ensayo de placas CAM (*Cell adhesive matrix*) descrito previamente<sup>158</sup>, con algunas modificaciones. La muestra tumoral se corta en trozos pequeños con la ayuda de dos hojas de bisturí. Posteriormente, los trozos son incubados en una solución enzimática de Colagenasa A (0.1%, Boehringer Mannheim) y DNasa (0.005%, Sigma) en HBSS (*Hank's balanced salt solution*), a 36°C, durante 6 h. con agitación continua. Se centrifuga la suspensión celular (1200 rpm, 6 min.) y el pellet se resuspende en medio DMEM adicionado con *Fetal calf serum* (10%, Gibco). El conteo de células tumorales viables se realiza mediante tinción con Tripan blue. Para el cultivo se han utilizado las CAM plates (Baker Sanger Inc.), placas multipocillos de 24 pocillos recubiertos de matriz adhesiva; y un medio comercial, *High Growth Medium* (Baker Sanger Inc.), compuesto de alfa-MEM, horse serum, human serum, epidermal growth factor (5 ng/ml) y otros factores de crecimiento. Se siembran las células a concentraciones diferentes (5, 10, 25 y 50.000 céls/pocillo) en cada una de las cuatro filas de la placa multipocillos. A las 24 h. se irradian las placas en una unidad de Cobalto (DFS: 67 cm.; tasa de dosis: 120 cGy/min) a dosis de 1, 2, 3 y 4 Gy. La segunda columna de la placa se utiliza para la medición del fondo. Las placas se incuban durante 14 días en estufa (37°C, Co<sub>2</sub>: 5%) al cabo de los cuales se retira el medio y se fijan los pocillos con glutaraldehído al 1% durante 10 min. Tras dos lavados con PBS se tiñen los pocillos con cristal violeta al 0.1% durante 20 min., se enjuagan las placas y se dejan secar durante la noche.

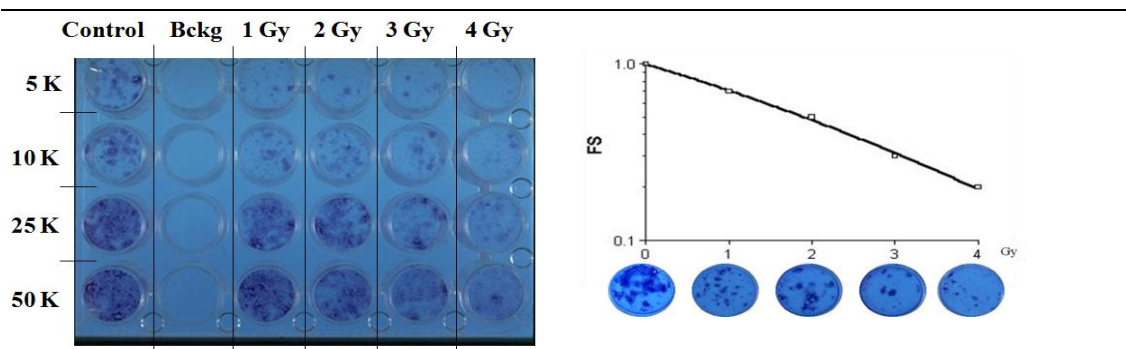
Para la lectura de las placas se resuspende el cristal violeta en ácido acético al 10% y se mide la absorbancia en un densitómetro óptico (Titertek multiscan) con un filtro de 450 nm. La fracción superviviente se calcula dividiendo la densidad óptica de cada dosis por su respectivo control. Los datos resultantes se ajustan al modelo lineal-cuadrático ( $\log FS = -\alpha D - \beta D^2$ ) y se calcula la FS<sup>152</sup>.



Disociado tumoral (HE, 125X)

Cultivo vivo en la placa. (MFI)

Tinción en placa con CV



Placa de cultivo multipocillos irradiada (CV, 1x)

Curva de supervivencia celular. Cálculo FS2

Figura 4: Proceso de cálculo de la FS2: disociación enzimática, cultivo, irradiación, teñido, lectura de las placas y elaboración de la curva de supervivencia.

HE: hematoxilina-eosina; MFI: microscopio de fase invertida; CV: cristal violeta; FS2: fracción superviviente a 2 Gy.

Para el análisis estadístico, se dividió a las pacientes en dos grupos en función del valor de la FS2 mayor o menor de 0.55.

**Evaluación inmunohistoquímica de los cultivos:** Con objeto de determinar la naturaleza de las células que crecieron en las placas de cultivo se diseñó una técnica de inmunohistoquímica modificada utilizando anticuerpos anti-citoqueratina. Esta evaluación se realizó en 8 muestras. Se seleccionaron los pocillos control de cada placa de cultivo para la realización de la inmunohistoquímica. En primer lugar, tras hidratación, se realizó la decoloración mediante ácido acético al 10% durante 20 minutos. Se realizó el desenmascaramiento antigénico mediante digestión enzimática con proteasa alcalina (Proteasa 1, Ventana Medical Systems) llevando a cabo una incubación de 12 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó una inhibición de la peroxidasa endógena incubando los pocillos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 10 minutos y

lavándose después con PBS. Se realizó una incubación de 10 minutos con suero normal no inmune para evitar uniones específicas. La tinción inmunohistoquímica se realizó empleando el cóctel prediluido de anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina AE1/AE3 (Signet Laboratoires, Burlinghan, CA). El anticuerpo primario fue incubado en los pocillos durante 40 minutos a temperatura ambiente y posteriormente lavado con PBS. Después se realizó una incubación de 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado, lavado con PBS e incubación con el complejo peroxidasa ABC durante 30 minutos. Tras nuevo lavado con PBS, la tinción de peroxidasa se reveló con 3-3' diaminobencidina (Signet Laboratories) durante 7 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se contratiñeron suavemente con hematoxilina y se cubrieron con medio de montaje acuoso. Se empleó como control positivo un cultivo de células HeLa y como control negativo un cultivo de fibroblastos, ambos procesados de manera idéntica a los cultivos del estudio.

**Medición del tiempo potencial de doblamiento (Tpot):** Se ha llevado a cabo según el método descrito previamente<sup>170</sup>. Brevemente, la muestra tumoral es fijada en etanol al 70%. Posteriormente se realiza extracción de los núcleos mediante incubación con pepsina (Sigma) al 0.04% en CIH 0.1 N, durante 30 min. Tras dos lavados con PBS-TB (PBS + Tween 20, 0.5% + Albúmina bovina, 0.5%), se desnaturaliza el DNA con CIH 2 N, durante 10 min., al final de los cuales se añade doble volumen de borato sódico 0.1 M. Tras dos lavados con PBS-TB se realiza incubación con Ac anti-BrdUrd (1:50, Becton-Dickinson) durante 1 h. en la oscuridad. Se realiza un nuevo lavado con PBS-TB resuspendiendo los núcleos en PBS-TG (PBS + Tween 20, 0.5% + Goat serum, 0.5%) e incubando con Ac goat anti-mouse-fluoresceina (1:25, Sigma) durante 30 min. Tras lavar de nuevo, se tiñe el DNA con Ioduro de propidio (1 microgr./ml) y se añade

Figura 5: Ejemplo de cálculo del Tpot en tumor de cérvix

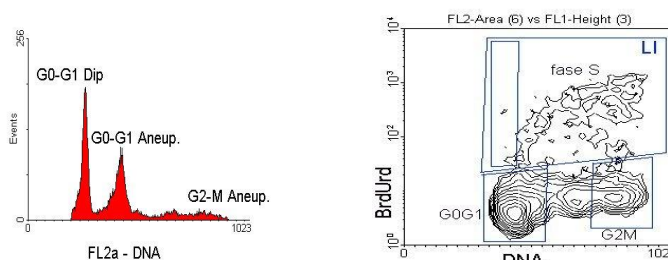


Tabla V: Fórmulas de cálculo del tiempo potencial de doblamiento

$RM = \frac{f_{lu} - f_{G0G1}}{f_{G2M} - f_{G0G1}} \quad Ts = \frac{0.4 \times t}{RM - 0.6} \quad LI = f_{lu} + \frac{f_{ld}}{2} \quad Tpot = \frac{\lambda \times Ts}{LI}$			
<p>RM: movimiento relativo; <math>f_{lu}</math>: fluorescencia roja de las células marcadas no divididas; <math>f_{G0G1}</math>: fluorescencia roja de las células en G0-G1; <math>f_{G2M}</math>: fluorescencia roja de las células en G2M. Ts: duración de la fase S; t: tiempo transcurrido entre la administración de la BrdUrd y la biopsia; LI: índice de marcaje (Labelling index); <math>f_{ld}</math>: fracción de células marcadas divididas; Tpot: tiempo potencial de doblamiento; <math>\lambda</math>: factor de corrección por envejecimiento celular.</p>			

RNasa (0.5 microgr./ml). Para la lectura en el citómetro (FACScan, Becton-Dickinson) se realiza primero la exclusión de los dobletes y tripletes. Posteriormente, a partir de un histograma doble de fluorescencia verde (BrdUrd) versus fluorescencia roja (DNA) se calcula el Tpot según el método de Begg<sup>170</sup>.

### 4.3 Perfiles moleculares

#### 4.3.1 Pacientes y características clínicas

En 67 pacientes de la serie se pudo obtener un bloque de parafina con la biopsia inicial pretratamiento para la elaboración de un perfil molecular mediante inmunohistoquímica. En el resto de pacientes no pudo obtenerse debido a diversas causas: pérdida del bloque, negativa del hospital de referencia, o mal estado de conservación.

La edad mediana de este grupo de pacientes fue de 64 años (34 – 90). En 5 p. se objetivó hidronefrosis y los valores de Cr media fueron de 1.24 gr/dl (0.5–17.4). Aproximadamente la mitad de las pacientes eran estadios IIIB-IVA y solo un pequeño porcentaje presentó adenopatías clínicamente patológicas en los estudios de imagen. El 10% de las pacientes presentaron una histología de adenocarcinoma de diversos subtipos. El grado histológico solo figuraba en el informe anatomo-patológico en el 37% de las pacientes.

Este grupo de pacientes recibieron idéntico tratamiento al descrito en el apartado 4.1.

#### **4.3.2 Inmunohistoquímica**

El análisis con inmunohistoquímica se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Puerta de Hierro realizándose la lectura de los cristales por parte de las Dras Carmen Bellas y Clara Salas.

Se seleccionó un panel de marcadores que están en relación con mecanismos potenciales de supervivencia tumoral como son aquellos relacionados con la hipoxia y angiogénesis, mediante la expresión de CD31 y COX2; vías de traducción de señal, estudiando la p53; apoptosis, en la que intervienen p53 y COX2; y proliferación tumoral, con el estudio del antígeno Ki67 y el EGFR.

**Técnica de inmunohistoquímica:** La técnica inicial es común para todos los anticuerpos. Con cada muestra se realizan los siguientes pasos:

- Desparafinación con xilol durante 15 minutos
- Rehidratación mediante pases sucesivos por alcohol en gradación decreciente (100º 10 min, 96º 5 min, y 70º 5 min) y lavado en agua destilada.
- Tripsinización durante 15 minutos y lavado en agua destilada.
- Para el bloqueo de la peroxidasa endógena se usó peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 15 minutos seguida de incubación en agua destilada durante 15 minutos.
- El desenmascaramiento antigénico se consiguió mediante incubación con solución buffer citrato 10 mM pH 6 y calentamiento a 120º en autoclave durante 15 minutos seguida de incubación con buffer TBST durante 10 minutos.
- Incubación con el anticuerpo primario correspondiente durante el tiempo recomendado para cada uno de ellos
- Tras la incubación se realizó lavado con PBS e incubación con el anticuerpo secundario biotinilado, seguida de lavado con PBS.



- Incubación con el complejo avidina-peroxidasa lavado con PBS, adición de la solución sustrato de peroxidasa y nuevo lavado con PBS.
- Tinción con hematoxilina y montaje.

La angiogénesis tumoral se determinó indirectamente mediante el estudio de la *densidad intratumoral de microvasos*, (IMVD) de acuerdo a los Criterios del Consenso Internacional de Cuantificación de Angiogénesis Intratumoral<sup>244</sup>. Se utilizó un anticuerpos anti CD31-PECAM1 (Dako®), que se dirige contra una proteína del endotelio por lo que se utiliza como marcador vascular.

Se buscaron principalmente zonas tumorales, de patrón infiltrativo en el área de avance tumoral en márgenes con poca necrosis o esclerosis. Las zonas seleccionada se examinan por microscopia en campo de gran aumento (cga, 200X), contándose el número de microvasos en, al menos, dos regiones con alta vascularización con tumor viable sin necrosis. Se hizo la media de las dos zonas examinadas la cual constituyó el valor del número de microvasos. Se consideraron como microvasos independientes cualquier célula teñida identificándose aquellos separados de otros y del tejido conectivo contándolos independientes. En el caso de identificar varios microvasos que dieran la impresión de ser uno solo cortado a nivel del plano de la muestra, se contarán de forma independiente. No se exigió la presencia de luz intravascular ni de células hemáticas en su interior para considerarlo microvaso.

Otras células positivas para CD31 dentro de la muestra se utilizaron como control interno en los casos negativos, aunque en todos los casos se tiñeron simultáneamente con controles positivos externos.

Para el análisis estadístico de la IMVD se tomó como punto de corte el correspondiente a la mediana de las determinaciones.

La actividad proliferativa del tumor se determinó mediante tinción del EGFR, y el antígeno nuclear Ki67, implicado en la división celular.

La expresión de EGFR se determinó, según la técnica descrita, usando como anticuerpo primario el anti-EGFR (DAKO®, Clone H11, ref.356301, 1:200). En cuanto a la elección del punto de corte para el análisis estadístico no hay acuerdo entre los distintos autores lo que dificulta la interpretación de los resultados. En diversas publicaciones se usa una escala semicuantitativa que va desde negativo a 3 ó 4 rangos de positividad<sup>97,175,250</sup>. Algunos autores utilizan un método semicuantitativo en el que miden la localización (membranosa o citoplásmica) y la intensidad, usando el producto de ambas para el análisis<sup>96</sup>; otros miden la intensidad<sup>174,251</sup>. Un punto de corte frecuentemente utilizado es considerar positividad cuando más del 10% de las células presenten tinción<sup>97,98,173</sup>. En otros estudios el punto de corte se situó en más del 5%<sup>99, 100</sup>. La medición manual de la intensidad obtiene resultados similares a los sistemas ópticos automáticos<sup>177</sup>. En menos publicaciones se ha considerado una tinción de más del 50% de las células como positiva<sup>179</sup>.

En diversos artículos se utiliza una puntuación que se obtiene del porcentaje, mediante una escala en 3 a 5 grupos, y la intensidad, valorada de 1 a 4<sup>96,174,177</sup>. El denominado *immunoreactive scoring system* (IRS) utiliza una puntuación de intensidad de 0-3 y de porcentaje de 0-4, para sumar una puntuación final de 0-7<sup>180</sup>. Otros autores consideran un valor positivo cuando el porcentaje es >5%<sup>99</sup>, >10%<sup>97,173,175,252</sup> o ≥50%<sup>179</sup>. En un estudio se consideró el EGFR positivo con porcentajes >0%<sup>176</sup>.

En nuestro estudio se incluyó al tumor en una de las cuatro categorías siguientes según la expresión de EGFR: negativo; <10%; 10-50%; y >50%. La variable se analizó estadísticamente como variable cualitativa, con dos categorías: ≤50% y >50%. En todos los casos al ser muestras de tumores epiteliales existía control interno positivo.

La tinción inmunohistoquímica para determinar el índice proliferativo con ki67 se realizó según la técnica descrita y usando como anticuerpo primario el MIB1 (DAKO). El porcentaje de células positivas se estableció a 200 aumentos, y el porcentaje final se cuantificó como la media de las distintas mediciones en los distintos campos.

En cuanto a los puntos de corte, en diversos trabajos se han establecido rangos para su análisis estadístico. Ancuța et al.<sup>64</sup> establecen 3 categorías: baja (10-30%), moderada (30-

50%) y alta proliferación (>50%). En otros casos se utilizó un punto de corte del 33% de células marcadas<sup>188</sup>. Varios estudios utilizan como punto de corte el valor medio o mediano observado en el propio estudio<sup>187,190</sup>.

Se consideró como tumores con alto índice proliferativo en nuestro estudio los que tenían una expresión de más del 10% de los núcleos, y la variable se analizó estadísticamente como variable cualitativa dividiendo los tumores en bajo índice proliferativo o alto índice proliferativo ( $\leq 10\%$  frente a  $>10\%$ ). Como control positivo externo se utilizó tejido amigdalario del banco del hospital.

La expresión nuclear de p53 mutada se evaluó mediante inmunohistoquímica usando el anticuerpo primario anti-p53, DO-7 (DAKO). El punto de corte de diversas series no es uniforme. Algunas utilizan el sistema IRS que asigna una puntuación total que es la suma de intensidad y porcentaje de células teñidas<sup>180</sup>. El punto de corte utilizado en otras series ha sido del 5%<sup>193</sup> ó 10%<sup>195,198</sup>.

La expresión de p53 se analizó estadísticamente como variable cualitativa, con dos categorías, expresión negativa en aquellos tumores en los que se detectó una expresión  $\leq 10\%$ , y expresión positiva para el resto de tumores. Como control positivo externo se utilizó un tumor de colon del banco del hospital.

La expresión de ciclo-oxigenasa 2 (COX2), se evaluó mediante tinción con anti-COX2 (Rabbit Monoclonal antibody, Cat. #RM-9121-R7, Lab Vision Corporation).

En cuanto a la metodología de lectura de la COX2, Gaffney et al.<sup>202</sup> usan una puntuación con 4 puntos de corte: 0: no tinción; 1:  $<10\%$ ; 2: 10-50%; y 3:  $>50\%$ . Esta puntuación se multiplica por un valor de 1 a 4 que representa la intensidad de la tinción, para obtener el valor final<sup>202</sup>. En este estudio se observó una correlación muy estrecha entre porcentaje e intensidad (Pearson 0.849,  $p=0.0002$ ) por lo que no sería necesario la determinación de ambas<sup>202</sup>. Otros autores<sup>102,203,206</sup>, utilizan la misma escala de distribución y consideran sobreexpresión cuando el número de células teñidas es  $\geq 50\%$ . Otros autores colocan el punto de corte en el 10% de células positivas para

COX2<sup>173,204</sup>. La expresión de COX2 también ha sido evaluada mediante el uso de software de dibujo y cálculo de la intensidad del brillo<sup>253</sup>.

En nuestro estudio se utilizó una escala de porcentaje de células positivas para COX2 incluyendo al tumor en una de las cuatro categorías siguientes según su expresión: negativo; <10%; 10-50%; y >50% La variable se analizó estadísticamente como variable cualitativa, con dos categorías: ≤50% y >50%. Como control se utilizó un tumor de colon del banco del hospital.

Para la determinación de la expresión de p16 se utilizó un anticuerpo anti-p16 (MTM). En la mayor parte de trabajos se utiliza una escala en función del porcentaje de células positivas combinada, en ocasiones con una escala de intensidad de 1 a 3<sup>212,254</sup>

En la lectura de los resultados de p16 se incluyó al tumor en una de las cuatro categorías siguientes según su expresión: negativo; <10%; 10-50%; y >50% La variable se analizó estadísticamente como variable cualitativa, con dos categorías: menor o igual al 10% y >10%. Como control se utilizó una lesión cervical por HPV del banco del hospital.

#### **4.4 Estadística**

Para el análisis descriptivo se realizó análisis de frecuencias en las variables cualitativas. En las variables cuantitativas se comprobó su distribución normal y se describieron la media, rango y mediana. Para comprobar la asociación de variables cualitativas se utilizaron tablas de entradas múltiples y el estadístico chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). El contraste de normalidad en las variables continuas para la comparación de medias entre grupos se realizó mediante la t de Student, para 2 muestras; o mediante ANOVA, en caso de variables múltiples.

Para el análisis de supervivencia se estimó el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento radioterápico hasta el tiempo de aparición del evento correspondiente o la fecha del último seguimiento. Se consideraron las siguientes estimaciones de supervivencia:

- Supervivencia global: desde el inicio del tratamiento radioterápico hasta la muerte del paciente.
- Supervivencia causa-específica: desde el inicio del tratamiento radioterápico hasta la muerte por enfermedad del paciente.
- Supervivencia libre de enfermedad: desde el inicio del tratamiento radioterápico hasta la muerte del paciente o la recidiva de cualquier tipo.
- Supervivencia libre de recidiva global: desde el inicio del tratamiento radioterápico hasta la recidiva de cualquier tipo.
- Supervivencia libre de recidiva pélvica: desde el inicio del tratamiento radioterápico hasta la recidiva local o ganglionar pélvica.
- Supervivencia libre de recidiva retroperitoneal: desde el inicio del tratamiento radioterápico hasta la recidiva retroperitoneal.
- Supervivencia libre de recidiva a distancia: desde el inicio del tratamiento radioterápico hasta la recidiva a distancia.

Para el análisis de la supervivencia actuarial se utilizó el método de Kaplan-Meier<sup>255</sup>, un método no paramétrico que expresa la probabilidad de aparición de un evento en un tiempo determinado. Este método recurre a la *censura* de aquellos pacientes en los que no se ha producido el evento. En el análisis univariante, para la comparación de curvas de supervivencia se utilizó el test de log-rank.

Dado que el estudio molecular no se realizó en todos los pacientes, para el análisis multivariante se realizaron 2 modelos: uno que incluyó todos los pacientes en el que se excluyeron las variables del análisis molecular; y otro que incluyó solo los pacientes con estudios moleculares. El análisis multivariante se llevó a cabo mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox<sup>256</sup> o de regresión múltiple que permite modelar la supervivencia en función de una serie de variables que son independientes unas de otras. En este modelo se consideró como variable dependiente el tiempo hasta el evento y se incluyeron en él aquellas variables significativas o con tendencia a la

significación ( $p < 0.01$ ) en el análisis univariante. A partir de los resultados se obtiene el hazard ratio de cada variable incluida en el modelo final.

El análisis estadístico se ha realizado con ayuda del programa estadístico SPSS v15.

En todos los análisis el nivel de significación estadística se situó en un error de tipo I menor del 5% ( $p < 0.05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estudio clínico

#### 5.1.1 Supervivencia global y causa-específica

En el momento del análisis 50/136 pacientes (36%) habían muerto. En 38 pacientes (28%) la causa de la muerte fue progresión de la enfermedad, mientras que en los restantes 12 pacientes la muerte fue debida a causa intercurrente.

La supervivencia actuarial global y causa específica fue del 59% y 65% a 5 años y del 43% y 60% a 10 años, respectivamente (Figura 6). La supervivencia libre de enfermedad actuarial a 5 y 10 años fue del 48% y 35%, respectivamente.

La supervivencia actuarial global a 5 años para los estadios IIA, IIB, IIIA, IIIB y IVA fue de 44%, 64%, 50%, 61% y 40%, respectivamente (Tabla VI).

#### 5.1.2 Control local y patrón de recidiva

En el momento del análisis, 48/136 pacientes ( 36%) habían presentado recidiva. El patrón de recidiva observado se detalla a continuación: local exclusiva en 27 pacientes (20%); retroperitoneal exclusiva en 4 pacientes (3%); distancia exclusiva en 4 pacientes

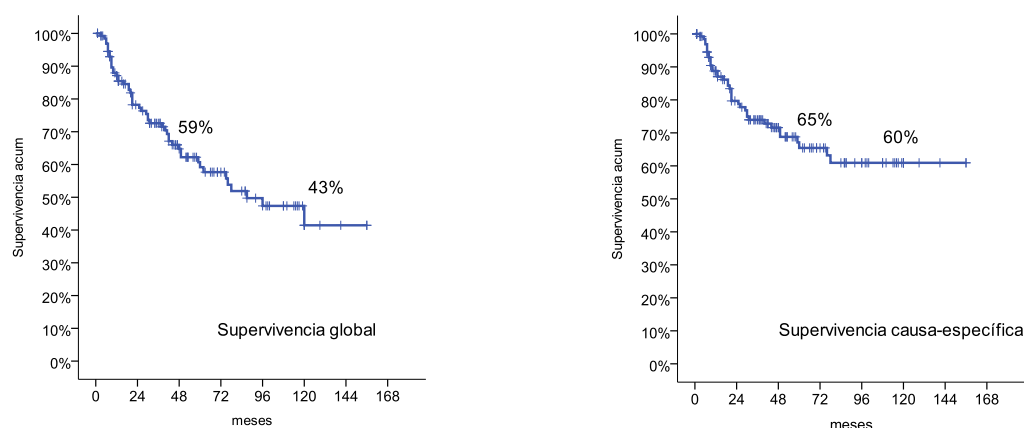


Figura 6: Gráficas de supervivencia actuarial global y causa-específica de la serie completa

Tabla VI: Supervivencia actuarial según estadios

Estadio	n	Global		Causa específica	
		5 años	10 años	5 años	10 años
IIA	6	44%	22%	66%	66%
IIB	54	64%	53%	71%	71%
IIIA	5	50%	50%	50%	50%
IIIB	58	61%	38%	63%	51%
IVA	13	40%	0%	60%	60%

(3%); local y retroperitoneal en 6 pacientes (4%); local y distancia en 4 pacientes (3%); retroperitoneal y distancia en 1 paciente (1%); y local, retroperitoneal y distancia en 2 pacientes (1%).

En las pacientes con estadio II la tasa de recidiva global fue del 28% (17/60 pacientes). En 15 pacientes se presentó una recidiva pélvica, asociada a recidiva retroperitoneal en 2 de ellos y a distancia en 3 de ellos. Dentro de este estadio, una paciente presentó una diseminación a distancia exclusiva y una paciente recidiva retroperitoneal exclusiva (Tabla VII).

Las pacientes con estadio III presentaron una tasa de recidiva global del 39% (25/63 pacientes). Diecinueve pacientes tuvieron una recidiva pélvica, asociada a recidiva retroperitoneal en 5 pacientes y a distancia en 1 paciente. En este estadio 4 pacientes presentaron una recidiva retroperitoneal exclusiva y 2 pacientes diseminación a distancia exclusiva (Tabla VII).

Finalmente, en el estadio IVA, la tasa de recidiva global fue del 46% (6/13 pacientes). Cinco pacientes presentaron recidiva local asociada a diseminación a distancia en 2 de ellas. Una paciente presentó diseminación a distancia exclusiva y no hubo recidiva retroperitoneal (Tabla VII).

Las tasas de recidiva pélvica, retroperitoneal y distancia estuvieron relacionadas con el estadio, aunque no existieron diferencias significativas estadísticamente. La tasa de diseminación a distancia fue del 8%, 5% y 23% para estadios II, III y IV, respectivamente ( $p=0.08$ ) (Tabla VII).



Tabla VII: patrón de recidiva según estadios.

	II	III	IV	p	Global
Pélvica	15/60 (25%)	19/63 (30%)	5/13 (38%)	NS	39/136 (28%)
Retroperitoneo	3/60 (5%)	10/63 (16%)	0/13 (0%)	0,05	13/136 (10%)
Distancia	5/60 (8%)	3/63 (5%)	3/13 (23%)	0.08	11/136 (8%)
Global	17/60 (28%)	25/63 (39%)	6/13 (46%)	NS	48/136 (36%)

La supervivencia actuarial libre de recidiva pélvica, retroperitoneal y a distancia a 3 y 5 años fue del 73% y 62%; 91% y 84%; y 92% y 86%, respectivamente (Figura 7).

### 5.1.3 Factores pronósticos clínico- terapéuticos

**Estadio clínico:** la supervivencia actuarial global a 5 y 10 años para los estadios II, III y IV fue del 61% y 48%; 60% y 37%; y 40% y 40%, respectivamente. Las cifras correspondientes a la supervivencia causa específica fueron del 70% y 70%; 62% y 49%; y 60% y 60%, respectivamente (Figura 8). No existieron diferencias estadísticamente significativas en supervivencia global ni causa específica según estadios, aunque hubo una tendencia no significativa hacia una peor supervivencia libre de enfermedad en estadios avanzados (SLE actuarial a 5 años del 53%, 46% y 32%, para estadios II, III y IV, respectivamente;  $p=0.05$ ) (Tabla VIII).

Las tasas de recidiva tanto pélvicas como retroperitoneales y a distancia se incrementaron con el estadio (Tabla VII), aunque las diferencias solo alcanzaron una tendencia no significativa estadísticamente para la recidiva retroperitoneal ( $p= 0.05$ ) y la recidiva a distancia ( $p=0.08$ ). No existieron diferencias en la supervivencia actuarial

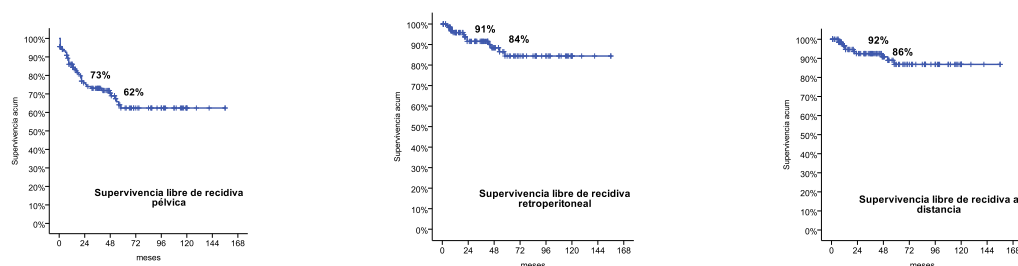


Figura 7: supervivencia actuarial libre de recidiva pélvica (izquierda), retroperitoneal (centro) y a distancia (derecha)

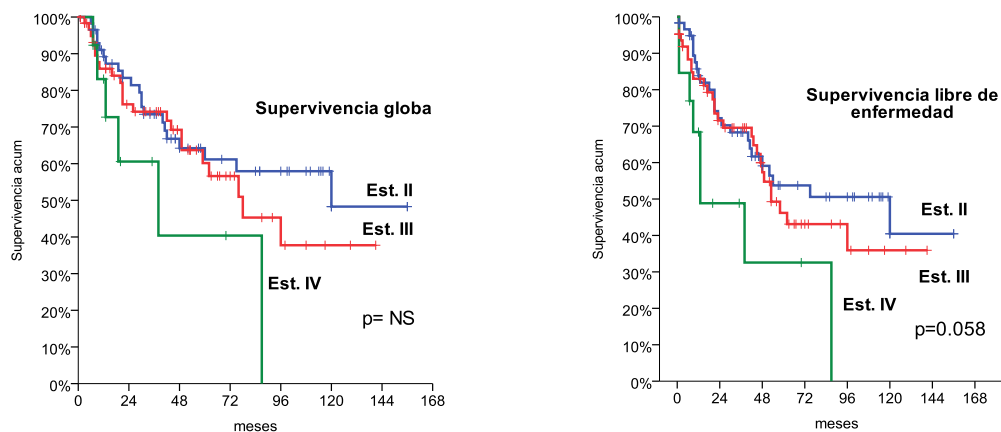


Figura 8: Supervivencia global (izquierda) y libre de enfermedad (derecha) en función del estadio clínico.

libre de recidiva a 5 años entre los diferentes estadios (68%, 59% y 58%, para estadios II, III y IVA, respectivamente,  $p=NS$ ). El estadio clínico tampoco influyó en la recidiva pélvica ni retroperitoneal. Sin embargo, las metástasis pulmonares fueron más frecuentes en el estadio IVA (supervivencia libre de diseminación a distancia a 5 años del 89%, para estadios II y III; frente al 69%, para estadios IVA,  $p=0.022$ ) (Tabla VIII).

La supervivencia libre de enfermedad actuarial a 5 años fue del 54%, 46% y 32% para los estadios II, III y IVA, respectivamente, existiendo una tendencia no estadísticamente significativa hacia una peor supervivencia en estadios III y IV (Figura 8) (Tabla VIII).

La afectación ganglionar resultó un factor de mal pronóstico para supervivencia y recidiva pero no alcanzó significación estadística debido al bajo número de pacientes que presentaban afectación ganglionar al diagnóstico. La tasa de recidiva en los pacientes sin y con ganglios positivos fue de 34% frente a 46% ( $p=NS$ ), para recidiva global; de 28% frente a 31% ( $p=NS$ ), para recidiva pélvica; de 8% frente a 28% ( $p=NS$ ), para recidiva retroperitoneal; y de 7% frente a 15% ( $p=NS$ ), para recidiva a distancia. La supervivencia global y causa específica actuariales a 5 años para pacientes sin y con ganglios positivos fue del 58% frente a 53% ( $p=NS$ ) y de 67% frente a 53% ( $p=NS$ ), respectivamente (Tabla VIII).

**Edad:** no hubo diferencias en la comparación de medias de edad entre las pacientes que presentaron una recidiva frente a las que no (60.8 años frente a 61.6 años); ni tampoco entre las pacientes muertas por enfermedad y las vivas (61 años en ambos casos).

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes menores y mayores de 40 años en cuanto a supervivencia actuarial causa específica (66% frente a 65% a 5 años, respectivamente), ni supervivencia actuarial libre de enfermedad (60% frente a 48%, respectivamente). Tampoco se objetivaron diferencias en cuanto a recidiva retroperitoneal ni a distancia en función de la edad de las pacientes.

**Niveles de hemoglobina:** El porcentaje de pacientes anémicas al inicio del tratamiento tomando como límites normales 11 ó 12 gr/dl fueron del 11% y 18%, respectivamente.

La Hb inicial media y mediana fue de 12,6 (8,1 - 16,7) y 12,7 gr/dl, respectivamente. Las cifras correspondientes a la Hb final fueron de 11,2 (7,9 - 14,8) y 11,2 gr/dl. En las pacientes que tuvieron más de 2 determinaciones los niveles de Hb mínimos medios y medianos fueron de 12 (7,2 - 16,7) y 12,2, respectivamente. La disminución media del nivel de Hb durante el tratamiento fue de 1,1 gr/dl.

Las pacientes con unos niveles de hemoglobina pretratamiento menores de 12 gr/dl tuvieron una peor supervivencia actuarial a 5 años tanto global (40% frente a 66%,  $p=0,02$ ) como causa específica (40% frente a 76%,  $p=0,003$ ), como se muestra en la figura 9. Igualmente, se objetivó una menor supervivencia libre de enfermedad actuarial a 5 años en las pacientes con niveles de Hb inferiores a 12 gr/dl (32% frente a 59%,  $p=0,004$ ; figura 9). Estas diferencias fueron significativas para la recidiva pélvica (41% frente a 69%,  $p=0,01$ ) y, especialmente, para la recidiva retroperitoneal (62% frente a 89%,  $p=0,0002$ ; figura 9) (Tabla VIII).

La Hb al final del tratamiento no tuvo valor pronóstico en supervivencia global, causa-específica o supervivencia libre de recidiva.

La anemia estuvo asociada a otros factores clínicos. Los niveles de Hb < 12 grt/dl fueron mas frecuentes en estadios avanzados (21%, 38% y 58% para pacientes con

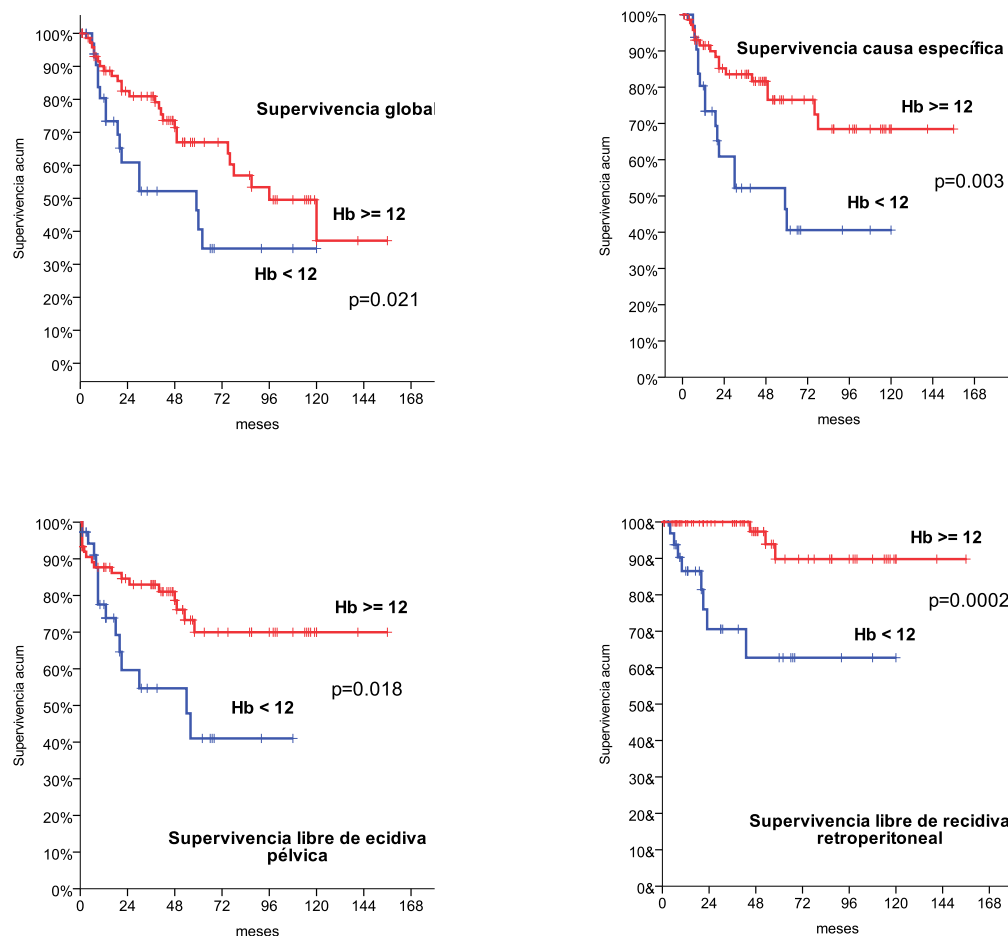


Figura 9: Influencia de los niveles de Hb inicial en la supervivencia global (arriba izquierda), causa específica (arriba derecha), control pélvico (abajo izquierda) y retroperitoneal (abajo derecha).

estadios II, III y IVA, respectivamente,  $p=0.031$ ). La anemia estuvo fuertemente asociada al volumen tumoral (Hb < 12 gr/dl en el 5% de los tumores < 4 cm frente al 39% en tumores >4 cm;  $p=0.002$ ). Del mismo modo, las pacientes con hidronefrosis presentaron una mayor incidencia de anemia (79% frente a 24%,  $p<0.001$ ) (Tabla VIII).

**Hidronefrosis y niveles de creatinina:** la presencia de hidronefrosis se objetivó en 19 pacientes (14%) y se comportó como un factor de mal pronóstico tanto para supervivencia actuarial global (Figura 10) como causa específica a 5 años (40% frente a 62%,  $p=0.004$ ; y 40% frente a 69%,  $p=0.002$ , respectivamente) (Tabla VIII).

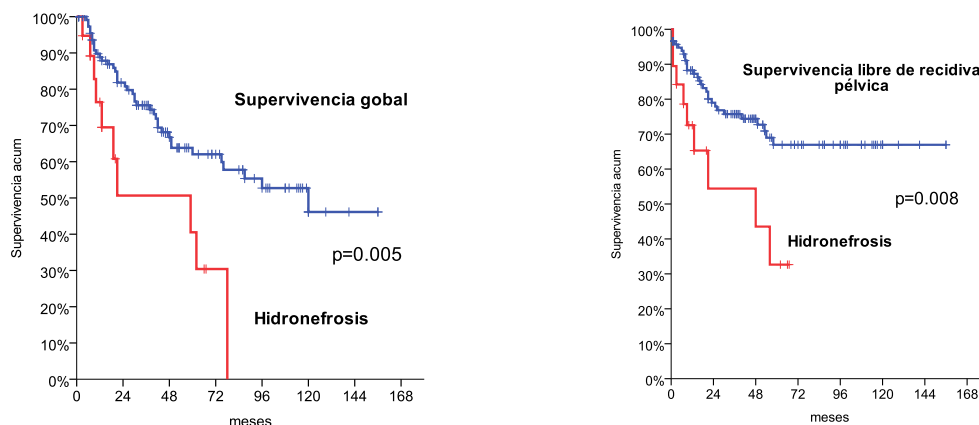


Figura 10: Supervivencia global (derecha) y libre de recidiva pélvica (izquierda) en función de la presencia o no de hidronefrosis.

Asimismo, la presencia de hidronefrosis se asoció con una menor supervivencia libre de enfermedad actuarial a 5 años (26% frente a 58%,  $p=0,002$ ). Esta diferencia fue debida fundamentalmente a un peor control de la enfermedad a nivel pélvico en los pacientes con hidronefrosis (supervivencia actuarial libre de recidiva pélvica a 5 años del 33% frente al 67%,  $p=0,008$ ). Existió una tendencia no significativa en las pacientes con hidronefrosis hacia una menor supervivencia libre de recidiva pélvica a 5 años (63% frente a 86%;  $p=0,08$ ) y recidiva a distancia a 5 años (77% frente a 95%;  $p=0,07$ ).

Catorce pacientes (13%) presentaron insuficiencia renal definida como niveles de creatinina superiores a 1,2 U/l. Este grupo de pacientes presentaron una tendencia no significativa hacia una menor supervivencia actuarial global (40% frente a 63%,  $p=0,06$ ) y causa específica (69% frente a 50%,  $p=0,05$ ) a 5 años. Los niveles de creatinina no tuvieron influencia en la supervivencia libre de enfermedad global.

**Afectación parametrial y/o vaginal:** el tipo de afectación parametrial no tuvo impacto en la supervivencia global ni causa específica. Las pacientes con afectación parametrial bilateral presentaron una menor supervivencia libre de recidiva retroperitoneal a 5 años (78% frente a 90%) y supervivencia libre de recidiva pélvica a 5 años (57% frente a 91%), pero las diferencias no alcanzaron significación estadística.

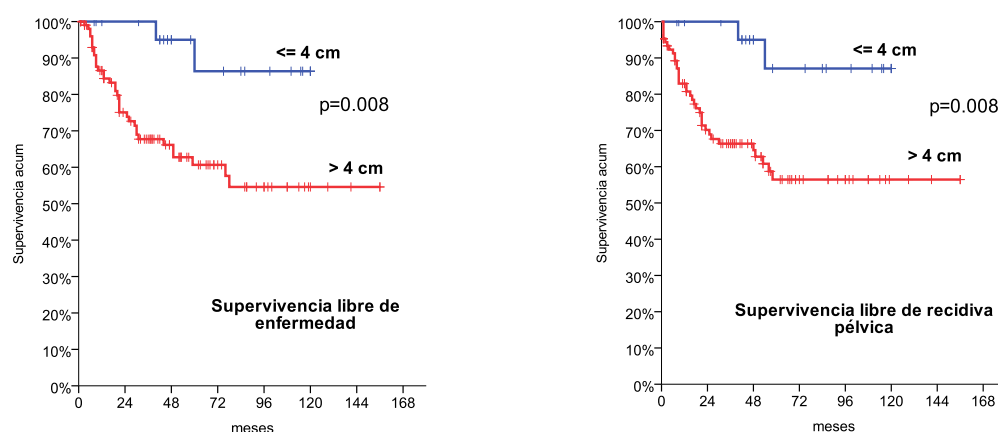


Figura 11: Supervivencia libre de enfermedad (derecha) y libre de recidiva pélvica (izquierda) en función del tamaño tumoral.

La afectación de tercio vaginal inferior tampoco influyó significativamente en la supervivencia global ni causa-específica. Sin embargo, estas pacientes tuvieron una supervivencia libre de recidiva pélvica a 5 años significativamente menor (36% frente a 66%,  $p=0.02$ ) (Tabla VIII).

**Tamaño tumoral :** las pacientes con tumores menores o iguales a 4 cm. tuvieron mejor control tumoral reflejado en una mejor supervivencia causa específica y libre de enfermedad actuariales a 5 años (86% frente a 61%,  $p=0.008$ ; y 87% frente a 48%,  $p=0.001$ , respectivamente). La supervivencia actuarial global no fue estadísticamente diferente para los dos grupos (Tabla VIII).

La mejor supervivencia causa-específica en las pacientes con tumores  $\leq 4$  cm. se debió a un mejor control pélvico (supervivencia actuarial libre de enfermedad pélvica a 5 años del 87% frente al 56%,  $p=0.008$ ) y retroperitoneal (supervivencia actuarial libre de enfermedad retroperitoneal a 5 años del 100% frente al 80%,  $p=0.04$ ) (Figura 11).

El tamaño medio para los estadios II, III y IV fue de 5.1, 9.4 y 10.2 cm, existiendo una correlación estadísticamente significativa entre ambos ( $p < 0.0001$ ).

**Tipo y grado histológicos:** se objetivó una tendencia no estadísticamente significativa hacia un peor control de la enfermedad en el adenocarcinoma y sus variantes cuando

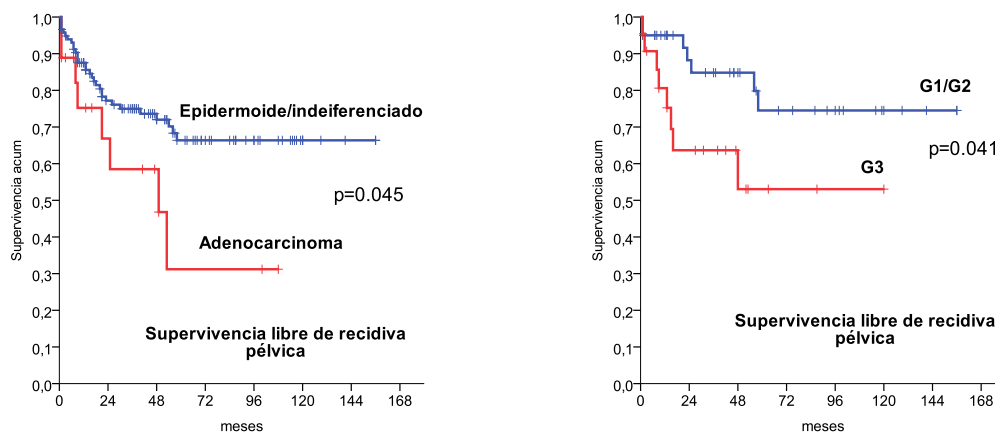


Figura 12: supervivencia libre de recidiva pélvica en función del tipo histológico (izquierda) y el grado histológico (derecha).

se comparó con el epidermoide (supervivencia libre de enfermedad global actuarial a 5 años del 22% frente al 58%,  $p=0,05$ ) (Tabla VIII).

Mientras que el subtipo histológico no influyó en la recidiva retroperitoneal, las pacientes con adenocarcinoma comparadas con las que presentaban epidermoide tuvieron una mayor recidiva pélvica (supervivencia libre de recidiva pélvica actuarial a 5 años del 31% frente al 66%,  $p=0,045$ )(Figura 12) y diseminación a distancia (supervivencia libre de enfermedad a distancia actuarial a 5 años del 75% frente al 89%,  $p=0,03$ ) (Tabla VIII).

Las pacientes con un grado histológico G3 presentaron una tendencia no estadísticamente significativa hacia una peor supervivencia global y causa-específica actuariales a 5 años (58% frente a 73%,  $p=0,08$ ; y 61% frente a 77%,  $p=0,05$ , respectivamente).

El grado histológico influyó en la recidiva pélvica presentando las pacientes con tumores G3 una supervivencia libre de recidiva pélvica actuarial a 5 años del 53% frente al 74% para las que tenían tumores G1-G2 ( $p=0,04$ )(Figura 12). Sin embargo no influyó ni en la recidiva retroperitoneal ni a distancia(Tabla VIII).

**Factores pronósticos terapéuticos:** las tasas de muerte global y causa-específica para dosis  $\leq 82$  Gy y  $>82$  Gy fueron similares (39% frente a 33% y 27% frente a 28%, respectivamente). Tampoco la tasa de dosis  $\leq 0.8$  Gy/d o  $> 0.8$  Gy/d influyeron en las tasas de muerte global y causa-específica. La dosis en puntos A y la tasa de dosis no tuvieron impacto en las tasas de recidiva local, retroperitoneal y a distancia.

La tasa de muerte global fue similar en las pacientes cuyo OTT fue  $\leq 50$  d. y las que fue  $> 65$  d., (37% frente a 30%). El alargamiento del OTT tampoco influyó en las tasas de recidiva local, retroperitoneal y a distancia.

La dosis en puntos A no influyeron en la supervivencia global actuarial a 5 años (52% frente a 65%, para dosis  $\leq 80$  Gy y  $>80$  Gy, respectivamente). La supervivencia libre de recidiva local actuarial a 5 años fue mayor en las pacientes que recibieron dosis  $> 80$  Gy, aunque sin significación estadística (67% frente a 53%). La dosis en puntos A tampoco influyó en la supervivencia libre de recidiva retroperitoneal ni a distancia.

La tasa de dosis y dosis en puntos B no fueron factores pronósticos para supervivencia global, causa-específica, libre de recidiva local, libre de recidiva retroperitoneal ni libre de recidiva a distancia.

La supervivencia global actuarial a 5 años fue del 59%, para OTT  $\leq 65$  d., frente al 61%, para OTT  $> 65$  d, sin existir diferencias significativas. Tampoco hubo diferencias en la supervivencia libre de recidiva local, retroperitoneal o distancia a 5 años en función del OTT menos o igual y mayor de 65 d. (60% frente a 64%; 86% frente a 62%; y 85% frente a 92%, respectivamente).



Tabla VIII: Factores pronósticos clínico-patológicos de la serie completa en el análisis univariante.

	SG*	p	SCE*	p	SLE*	p	SLRP*	p	SLRR*	p	SLRD*	p
<b>Estadio</b>												
II	61%		70%		54%		69%		94%		88%	
III	60%		62%		46%		58%		73%		89%	
IVa	40%	0.15	61%	0.28	33%	0.058	59%	0.26	100%	0.068	69%	0.022
<b>Hb</b>												
< 12 gr/dl	34%		41%		32%		41%		63%		87%	
≥ 12 gr/dl	71%	0.031	76%	0.003	60%	0.003	70%	0.018	90%	0.0002	81%	0.79
<b>Cr</b>												
≤ 1.2 mg/dl	63%		69%		54%		64%		83%		86%	
> 1.2 mg/dl	40%	0.06	50%	0.05	52%	0.3	51%	0.12	83%	0.98	82%	0.35
<b>Hidronefrosis</b>												
No	62%		69%		58%		67%		86%		88%	
Sí	41%	0.005	40%	0.002	26%	0.002	33%	0.008	63%	0.09	77%	0.07
<b>Tamaño</b>												
≤ 4 cm	69%		86%		86%		87%		100%		100%	
> 4 cm	57%	0.18	61%	0.008	61%	0.008	56%	0.008	80%	0.048	86%	0.06
<b>1/3 i. vagina</b>												
No	60%		67%		58%		66%		84%		86%	
Sí	56%	0.46	56%	0.43	30%	0.03	36%	0.02	83%	0.42	92%	0.98
<b>Grado</b>												
1-2	73%		77%		67%		74%		83%		83%	
3	58%	0.08	61%	0.05	39%	0.045	53%	0.041	88%	0.9	66%	0.09
<b>Histología</b>												
Adenoca.	33%		38%		22%		31%		84%		76%	
Epidermoide	63%	0.1	69%	0.08	59%	0.019	66%	0.044	84%	0.5	88%	0.32

\*: todas las cifras se refieren a 5 años. SG: supervivencia global; SCE: supervivencia causa específica; SLE: supervivencia libre de enfermedad; SLRP: supervivencia libre de recidiva pélvica; SLRR: supervivencia libre de recidiva retroperitoneal; SLRD: supervivencia libre de recidiva a distancia.

#### 5.1.4 Toxicidad tardía

Globalmente el 49% (67 de 136 pacientes) presentaron algún tipo de toxicidad tardía relacionada con el tratamiento. Según el órgano o sistema afecto las tasas brutas de toxicidad de cualquier grado fueron: intestinal: 28% (38 pacientes); urinaria: 14% (20 pacientes); vascular: 3% (4 pacientes); cutánea: 2.2% (3 pacientes); útero-vulva-vagina: 21% (29 pacientes); tejidos blandos: 0.7% (1 paciente); hueso: 1.5% (2 pacientes); y nervio periférico: 0.7% (1 paciente). La descripción del tipo de toxicidad se detalla en la Tabla IX.

**Toxicidad tardía intestinal:** las pacientes que presentaron toxicidad tardía intestinal se distribuyeron de la siguiente manera: grado I: 19 pacientes; grado II: 16 pacientes; y grado III: 9 pacientes. El efecto tardío más frecuente fue la rectorragia leve, seguido de la rectitis actínica que precisó tratamiento (Tabla IX)

La probabilidad actuarial a 5 y 10 años de presentar toxicidad intestinal de cualquier grado fue del 38% y 44%. Las cifras correspondientes a 10 años para toxicidad moderada-severa y severa fueron del 36% y 13%, respectivamente (Figura 13).

En el análisis de los factores predictivos de toxicidad intestinal la existencia de cirugía abdominal previa; niveles de Hb; dosis en puntos A, B o superficie; y tasa de dosis en punto A no tuvieron valor pronóstico. Aunque la edad media de las pacientes que presentaron toxicidad fue mayor que las que no la presentaron, la diferencia no fue estadísticamente significativa (64 frente a 60 años,  $p=0.08$ )

Las dosis superiores a 75 Gy en punto rectal se asociaron con una mayor probabilidad actuarial a 10 años de toxicidad intestinal (57% frente a 38%,  $p=0.04$ ). Esta diferencia se mantuvo para las complicaciones moderadas-severas, aunque solo con tendencia no significativa estadísticamente (34% frente a 23%,  $p=0.09$ ). La toxicidad intestinal fue similar entre las pacientes con un cociente entre dosis en punto A y punto rectal mayor o menor de 0,8.

Las tasas de dosis media y mediana en punto rectal fueron de 0.54 cGy/h (rango: 0.28 - 1.04) y 0.53 cGy/h. La tasa de dosis media en punto rectal fue mayor en las pacientes

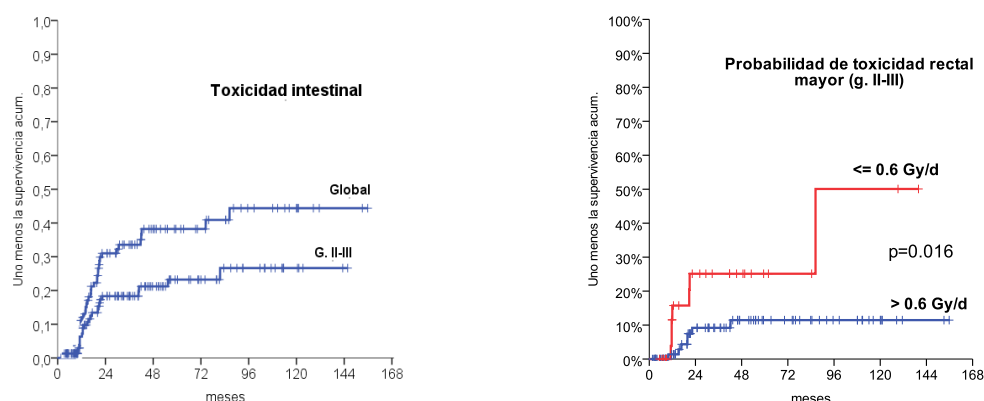


Figura 13: Incidencia acumulada de toxicidad intestinal global (izquierda) y rectal en función de la tasa de dosis rectal (derecha)

que presentaron toxicidad rectal g. II-III (0.61 frente a 0.53 Gy/h,  $p=0.03$ ). La tasa de dosis rectal influyó significativamente en la probabilidad actuarial a 3 años de toxicidad rectal mayor (22% frente a 50% para tasa inferior o mayor de 0,6 Gy/h, respectivamente;  $p=0.016$ ; figura 13).

El análisis del impacto de la dosis en la toxicidad rectal mayor en función de la tasa de dosis muestra un incremento lineal de la toxicidad a medida que se aumenta la dosis, pero solo en las pacientes con tasa de dosis  $> 0.6$  Gy/h (Figura 14).

La toxicidad intestinal de cualquier tipo, tanto global como mayor también fue mayor con tasas de dosis superiores a 0.6 Gy/h (probabilidad actuarial a 3 años de 100% frente a 35%,  $p=0.04$ ; y 67% frente a 14%,  $p=0.02$ , respectivamente).

La utilización de cilindros como parte de la braquiterapia incrementó la toxicidad

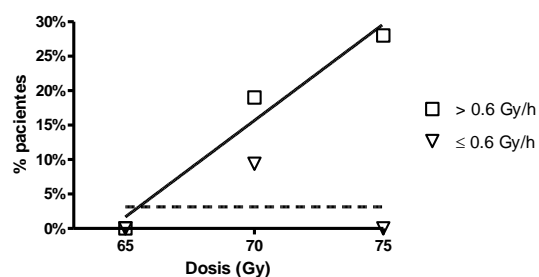


Figura 14: Influencia de la dosis en punto rectal en las complicaciones en función de la tasa de dosis.

intestinal de forma significativa (probabilidad actuarial a 10 años de toxicidad intestinal del 61% frente al 31%,  $p=0.03$ ). Este incremento se objetivó también para la toxicidad intestinal moderada-severa, aunque las diferencias no fueron significativas (44% frente a 32%,  $p=0.07$ ).

**Toxicidad tardía sistema urinario:** la distribución de pacientes según el grado de toxicidad del sistema urinario, así como la descripción de la misma, se muestra en la Tabla IX. Globalmente se presentó toxicidad grado I en 12 pacientes (8,8%); grado II en 6 pacientes (4.4%); y grado III en 3 pacientes (2.2%). Los efectos tardíos del sistema urinario mas frecuentes fueron la cistitis de diversos grados y la hematuria.

La probabilidad actuarial a 10 años de toxicidad urinaria global, moderada-severa y severa fue del 29%, 19% y 5%, respectivamente. La curva de probabilidad actuarial se muestra en la Figura 15.

Ninguno de los siguientes factores influyeron en la toxicidad urinaria tardía: edad; existencia de cirugía previa; niveles de Hb; niveles de creatinina superiores a 1.2; utilización de cilindros vaginales; tiempo total de tratamiento; tasa de dosis en punto A; dosis total en punto A, B o superficie; tasa de dosis en punto vesical; ni cociente dosis en vejiga partido por dosis en punto A mayor o menor de 1.

La existencia de hidronefrosis incrementó significativamente la toxicidad urinaria (probabilidad actuarial a 10 años de toxicidad urinaria del 58% frente al 27%,  $p=0.01$ ; figura Figuratoxvesical). Estas diferencias se mantuvieron para la toxicidad moderada-severa (33% frente a 16%,  $p=0.08$ ) y severa (38% frente a 2%,  $p=0.0002$ ).

Igualmente existió una mayor toxicidad en las pacientes con estadio III comparadas con las que presentaron estadio II (45% frente a 19% a 10 años,  $p=0.04$ )(Figura 15).

No existieron diferencias en cuanto a la dosis media recibida en punto vesical entre las pacientes con y sin toxicidad urinaria (77 Gy frente a 75 Gy,  $p=NS$ ). Tampoco hubo diferencias cuando se analizó exclusivamente la toxicidad a nivel de vejiga urinaria (76 Gy frente a 76 Gy,  $p=NS$ ).

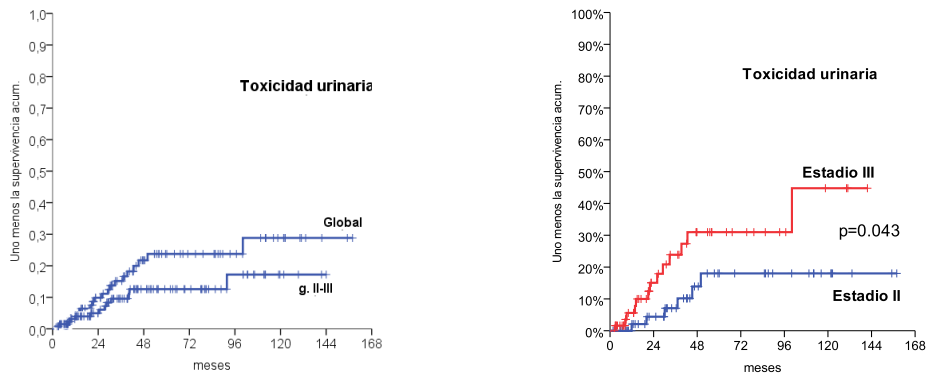


Figura 15: Probabilidad actuarial de toxicidad urinaria (izquierda) y en función del estadio (derecha).

**Otras toxicidades:** en cuanto a la cleisis vaginal, que fue la complicación más frecuente siendo observada en 29 pacientes (21%), estuvo relacionada con la dosis total en superficie, aunque las diferencias no fueron significativas (dosis media de 101 Gy frente a 96 Gy para las pacientes con y sin toxicidad, respectivamente;  $p=NS$ ). La utilización de cilindros vaginales durante la braquiterapia no incrementó la aparición de cleisis vaginal, observándose incluso el efecto contrario (probabilidad actuarial de cleisis de cualquier grado a 10 años del 31% frente al 40%,  $p=NS$ ).

Tabla IX: Descripción de las toxicidades observadas según el French-Italian Glossary

	Grado	Descripción	n (%)
Intestinal	I	Rectorragia leve	15 (11%)
		Hiperhemia y/o telangiectasias rectales	3 (2.2%)
		Diarrea leve	1 (0.7%)
	II	Rectitis que requiere tratamiento	8 (5.8%)
		Úlcera rectal	2 (1.4%)
		Estenosis rectal	1 (0.7%)
		Diarrea persistente	2 (1.4%)
		Obstrucción intestinal sin cirugía	3 (2.2%)
	III	Fístula recto-vaginal	4 (2.9%)
		Estenosis rectal quirúrgica	1 (0.7%)
		Obstrucción intestinal quirúrgica	4 (2.9%)
Urinaria	I	Cistitis leve	4 (2.9%)
		Incontinencia de stress	2 (1.4%)
		Hematuria leve	3 (2.2%)
		Retención urinaria	3 (2.2%)
	II	Hematuria que requiere tratamiento	2 (1.4%)
		Cistitis de repetición	1 (0.7%)
		Estenosis uretral con dilataciones	1 (0.7%)
		Estenosis ureteral	2 (1.4%)
	III	Incontinencia total	1 (0.7%)
		Estenosis ureteral con nefrostomía permanente y/o riñón no funcionando	2 (1.4%)
Vagina/vulva	I	Cleisis vaginal menor de la mitad	22 (16.1%)
	II	Cleisis vaginal mayor de la mitad	3 (2.2%)
	III	Cleisis vaginal completa	4 (2.9%)
Otras	I	Linfedema leve no incapacitante MMII	4 (2.9%)
		Neuropatía sin incapacidad funcional	1 (0.7%)
	II	Telangiectasias cutáneas	2 (1.4%)
		Fractura que no requiere cirugía	1 (0.7%)
	III	Radionecrosis cutánea	1 (0.7%)
		Necrosis ósea	1 (0.7%)

### ***5.1.5 Análisis multivariante***

Para el análisis multivariante se incluyeron en el modelo de Cox las variables con significación o con tendencia a la significación estadística ( $p < 0.1$ ). Dado que solo se dispuso del grado histológico en 62 p, este no se incluyó en el análisis multivariante. Se realizó este análisis para recidiva global, recidiva pélvica, supervivencia globlas y supervivencia causa específica. El bajo número de eventos de recidva retroperitoneal y a distancia hacen que el ajuste al modelo de Cox no sea correcto y, por tanto, no se realizó el análisis para estos resultados clínicos.

Si bien el el riesgo de sufrir el evento correspondiente para los factores de mal pronóstico estuvo por encima de 1 en todos los casos, ninguno de ellos mostró significación estadística. Las pacientes con Hb  $< 12$  gr/dl presentaron un mayor riesgo de recidiva global (HR: 2.18), con tendencia a la significación estadística ( $p=0,069$ ); y, aquellas con infiltración del 1/3 inferior vaginal, un mayor riesgo de recidiva pélvica (HR: 2.53) también con tendencia a la significación estadística ( $p=0.065$ ). (Tabla X)

Tabla X: Análisis multivariante de factores clínicos y terapéuticos (Modelo 1, todas las pacientes)

	<b>Hazard ratio</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
<b>Recidiva global</b>			
Hb < 12 gr/dl	2.18	0.94-5.08	0.069
Hidronefrosis	1.64	0,67-4.04	0.276
1/3 inf. vagina	1.97	0.8-4.86	0.126
Adenocarcinoma	1.99	0.85-4.64	0.111
Tamaño > 4 cm	3.17	0.71-14.1	0.128
<b>Recidiva pélvica</b>			
Hb < 1.2 gr/dl	2.06	0.79-5.42	0.121
Hidronefrosis	2.06	0.76-5.57	0.153
1/3 inf. vagina	2.53	0.93-6.89	0.068
Adenocarcinoma	1.96	0.74-5.18	0.174
Tamaño > 4 cm.	2.1	0.45-9.81	0.341
<b>Supervivencia global</b>			
Hb < 1.2 gr/dl	1.29	0.53-4.65	0.531
Cr > 1.2 gr/dl	1.66	0.62-4.42	0.305
Hidronefrosis	1.58	0.53-4.65	0.406
<b>Supervivencia causa específica</b>			
Hb < 1.2 gr/dl	1.81	0.71-4.55	0.207
Cr > 1.2 gr/dl	1.45	0.43-4.92	0.545
Hidronefrosis	1.58	0.46-5.44	0.466
Adenocarcinoma	2.32	0.86-6.29	0.096
Tamaño > 4 cm.	2.63	0.58-11-96	0.219



## 5.2 Ensayos predictivos de respuesta

### 5.2.1 Determinación de la fracción superviviente a 2 Gy

El cultivo pudo establecerse en 10 p. (67%). En el resto de casos las causas del fracaso del cultivo fueron contaminación o crecimiento insuficiente.

La FS2 media fue de 0,55 (0.38 – 0.74). La FS2 media fue de 0.5 frente a 0.61 para pacientes con recidiva o sin ella, respectivamente ( $p=NS$ ) y de 0.56 frente a 0.53 para pacientes vivos o muertos ( $p=NS$ ).

Tomando como punto de corte la media de FS2, la supervivencia actuarial a 5 años fue del 40% frente al 60% para valores de FS2 por debajo y por encima de 0.55, respectivamente ( $p=NS$ ). La supervivencia actuarial libre de recidiva a 5 años fue de 20% frente a 60% para FS2 mayor o menor de 0.55, sin que tampoco esta diferencia alcance significación estadística (Figura 16)

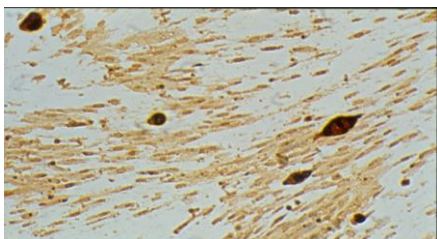


Figura 17: IHQ de la placa de cultivo que muestra escasa positividad para citoqueratina (<1%)

**Evaluación inmunohistoquímica de las placas de cultivo:** las células cultivadas presentaron. En microscopia óptica, una morfología fusiforme, con pocas atipias, que coincidía más con fibroblastos que con células tumorales. De las 8 muestras procesadas mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-citoqueratina, 4 (50%) fueron

negativas; en 3 (38%) se observó un porcentaje variable, entre el 1 – 25%, de células

Tabla XI: Valores medios de los diferentes parámetros de proliferación.  $p=NS$  en todos los casos

	Media (IC 95%)	Recidiva local		Supervivencia	
		Si	No	Sí	No
Tpot	8.95 d. (5-12.5)	5.58 d.	14 d.	5.5 d.	14.1 d.
LI	0.05 (0.03-0.06)	0.04	0.02	0.07	0.04
DNAi	1.45 (1.23-1.67)	1.34	1.76	1.37	1.58
Fase S	0.22 (0.16-0.28)	0.21	0.27	0.23	0.21
Tpot: tiempo potencial de doblamiento; LI: Labelling index; DNAi: DNA index; Fase S: duración fase S					

positivas (Figura 17); y solo un cultivo fue positivo en el 100% de las células. En este último cultivo las células adoptaron una disposición en colonias característico de células tumorales.

### 5.2.2 Medición del tiempo potencial de doblamiento (Tpot)

La medición del Tpot se pudo obtener en 14/15 p. (93%). Los valores de los distintos parámetros se muestran en la Tabla XI. El Tpot medio fue de 8.95 d. (IC 95% 5.3 - 12.5) y la mediana de 6 d. El Tpot medio de las pacientes que recidivaron localmente fue menor que el de las enfermas que no lo hicieron, pero al ser una muestra pequeña las diferencias no resultaron significativas: Tpot medio de 5.58 d. (IC 95% 3.08 – 8.08) frente a 14 d. (IC 95% 0.8 – 27.3, respectivamente,  $p=NS$ ). La misma situación se produce en cuanto a supervivencia: Tpot medio de 5.5 d. (IC 95% 3 – 8) frente a 14.1 d. (IC 95% 1.1 – 27.1), para pacientes muertas y vivas, respectivamente,  $p=NS$ .

El resto de parámetros de proliferación se muestran en la Tabla XI. Ninguno de los parámetros alcanzó significación estadística cuando se compararon las medias de los pacientes con recidiva local y sin ella y los pacientes vivos con los muertos.

La supervivencia libre de recidiva local (Figura xx) y supervivencia actuariales a 5 años fueron del 37% frente al 38%; y del 25% frente al 57%, para valores del Tpot inferiores o superiores a 6 d., respectivamente. Si bien la supervivencia fue menor en el grupo de Tpot más cortos, ninguna de estas diferencias alcanzó significación estadística.

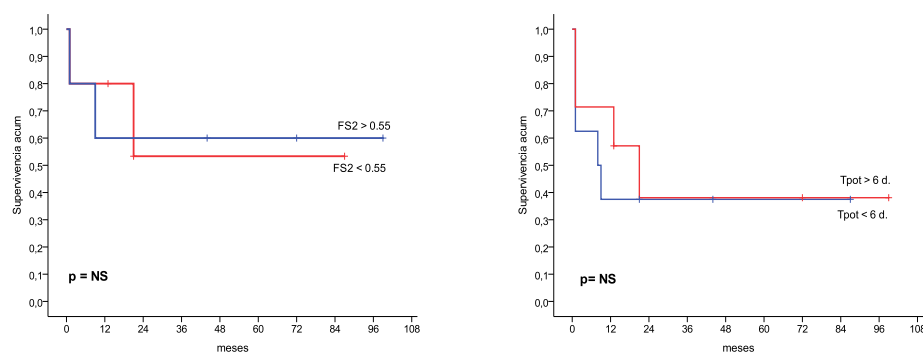


Figura 16: Supervivencia libre de progresión local de las pacientes incluídas en el estudio de ensayos predictivos, en función de la FS2 (izquierda) y el Tpot (derecha)

## 5.3 Perfiles moleculares de respuesta

### 5.3.1 Características del subgrupo de pacientes con perfil molecular

En 67 pacientes se obtuvo el bloque de parafina para la realización de la inmunohistoquímica. La edad media y mediana de este grupo fue de 64.6 años (34-90) y 65 años, respectivamente. La distribución por estadios fue la siguiente: II: 27 p. (40.3%); III: 34 p. (60.7%); IV: 6 (9%). En 7 casos (10.4%) la histología fue adenocarcinoma y en los 60 restantes (89.6%) epidermoide. La Hb inicial media fue de 13 gr/dl (8,1-16.7) y 15 p, (22.4%) estaban anémicas antes del inicio del tratamiento. Seis pacientes (9%) presentaban una Cr >1.2 mg/dl y 9 p. (13.4%) tenían hidronefrosis. El tamaño tumoral medio fue de 7.2 cm. (2-15).

### 5.3.2 Frecuencias y correlación con parámetros clínicos

Diversas imágenes de la IHQ de los marcadores analizados pueden verse en la Figura 18.

El porcentaje de células positivas medio de COX2 fue del 24% (0-85) y casi la mitad de los casos presentaron un porcentaje de positividad < 10%. El EGFR fue intensamente positivo en la mayor parte de los casos, con mas de la mitad de los pacientes con un porcentaje de células positivas >50%. El porcentaje medio de positividad para EGFR fue del 45.6%. La mayor parte de las pacientes presentaron p53 negativa frente a solo una cuarta parte en la que fue positiva. Los tumores presentaron un alto índice proliferativo con un Ki67 medio del 27.6%. La p16 fue intensamente positiva en mas de 2/3 de los pacientes lo cual se refleja en un porcentaje medio de células positivas del 58.9%.

Los distintos valores de los factores moleculares se muestran en la Tabla XII. Teniendo en cuenta los puntos de corte seleccionados (ver apartado Material y métodos) para el análisis los porcentajes de cada grupo serían COX2 negativo ( $\leq 50\%$ ): 76.1%, frente a COX2 positivo ( $> 50\%$ ): 23.9%; EGFR negativo ( $\leq 50\%$ ): 45.3%, frente a EGFR positivo ( $> 50\%$ ): 54.7%; p53 negativo: 73.4%, frente a p53 positivo: 26%; ki67  $\leq 10\%$ : 38.1%, frente a Ki67  $>10\%$ : 61.9%; y p16 negativo: 13.6%, frente a p16 positivo: 86.4%.

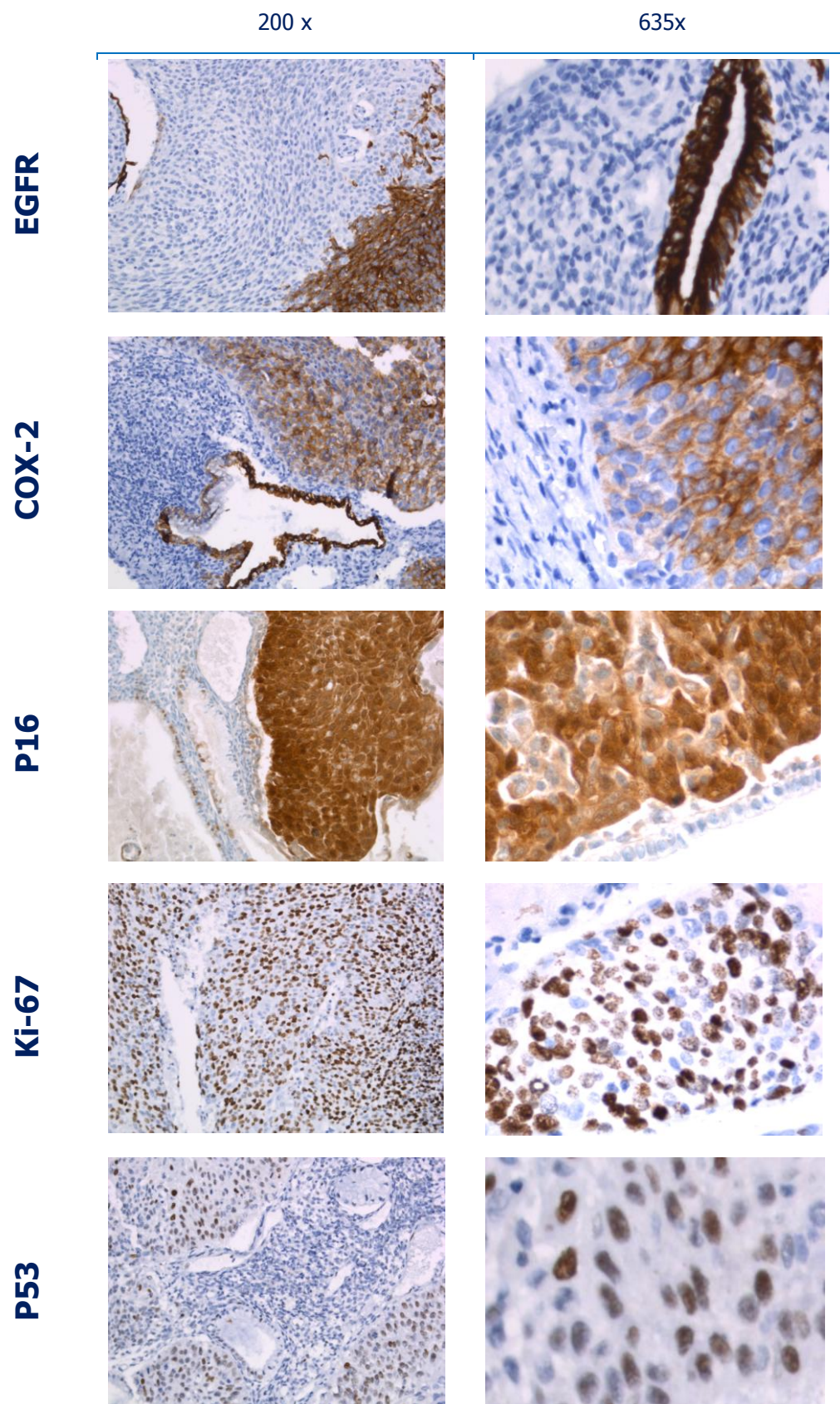


Figura 18: Imágenes de la IHQ de nuestras positivas para los diferentes marcadores. La tinción para p53 y Ki67 fue predominantemente nuclear y la de EGFR, COX2 y p16 a nivel membranoso y/o citoplásmico

Tabla XII: Frecuencia de los diferentes marcadores moleculares

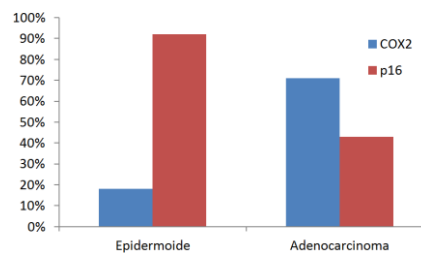
	Frecuencia	Grupos
<b>COX2</b>		
Negativo	26/67 (38.8%)	
≤ 10%	14/67 (20.9%)	≤ 50%: 51/67 (76.1%)
10-50%	11/67 (16.4%)	> 50%: 18/67 (23.9%)
>50%	16/67 (23.9%)	
<b>EGFR</b>		
Negativo	5/64 (7.8%)	≤ 50%: 29/64 (45.3%)
≤ 10%	17/64 (26.6%)	> 50%: 35/64 (54.7%)
10-50%	7/64 (10.9%)	
>50%	35/64 (54.7%)	
<b>p53</b>		
Negativa	57/64 (73.4%)	Negativo: 57/64 (73.4%)
Positiva	17/64 (26%)	Positivo: 17/64 (26%)
<b>Ki67</b>		
≤ 10%	24/63 (38.1%)	≤ 10%: 24/63 (38.1%)
10-50%	29/63 (48%)	>10%: 39/63 (61.9%)
>50%	10/63 (15.9%)	
<b>p16</b>		
Negativa	8 (13.6%)	Negativo: 8/59 (13.6%)
I	3 (5.1%)	Positivo: 51/59 (86.4%)
II	3 (5.1%)	
III	45 (76.3%)	

Se analizó la correlación entre las variables clínico-patológicas y cada factor molecular.

La expresión de COX2 estuvo relacionada con el tamaño tumoral, siendo la positividad de COX2 en los pacientes con tumores ≤ 4 cm del 0% frente a los tumores > 4 cm en que fue del 28% (p=0.02). Igualmente, el adenocarcinoma presentó un mayor porcentaje de COX2 que los tumores epidermoides (71% frente al 18%, p=0.007)(Figura 19).

Existió una correlación entre la expresión de EGFR y el estadio. Los porcentajes de pacientes con EGFR positivo para los estadios II, III y IV fueron 31%, 69% y 83%, respectivamente (p=0.005). El porcentaje de tumores EGFR positivos también fue estadísticamente superior en tumores > 4 cm frente a los ≤ 4cm (62% frente a 21%, p=0.009) y en las pacientes con hidronefrosis (87% frente a 50%, p=0.049). Las pacientes con adenocarcinoma también presentaron un mayor porcentaje de positividad de EGFR que las pacientes con epidermoide, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística (83% frente a 52%, p=NS).

Figura 19: se muestra el diferente patrón molecular que resentan los tumores epidermoides ( $\downarrow$ COX2 y  $\uparrow$ p16) frente al grupo de adenocarcinomas ( $\uparrow$ COX2 y  $\downarrow$ p16)



No se encontró correlación de la p53 ni el índice Ki67 con ninguna de las variables analizadas.

Se observó una fuerte correlación de la expresión de p16 con el subtipo histológico. El porcentaje de tumores p16+ fue significativamente superior en los tumores epidermoides comparado con los adenocarcinomas (92% frente a 43%,  $p=0.004$ )(Figura 19). La p16 no se correlacionó con ninguna otra variable.

### ***5.3.3 Recidiva pélvica, retroperitoneal y distancia en el subgrupo de pacientes con estudio molecular***

Se presentó recidiva tumoral en 27 p. (40.3%), esta fue pélvica en 22 p.; retroperitoneal en 9 p.; y a distancia en 6 p. La tasa de recidiva global fue mayor en las pacientes con hidronefrosis (77.8% frente a 35%;  $p=0.025$ ); afectación de 1/3 inferior vaginal (72.7 frente a 32.9%;  $p=0.022$ ); tamaño tumoral  $>4$  cm (48% frente a 7.1%;  $p=0.005$ ). Hubo una tendencia no significativa hacia una mayor recidiva global en las pacientes con adenocarcinoma frente a epidermoide (71.4% frente a 36.7%;  $p=0.08$ ). Las tasas de recidiva pélvica también fueron mayores en los pacientes con hidronefrosis ( $p=0.05$ ), afectación 1/3 inferior de vagina ( $p=0.023$ ), tamaño tumoral  $>4$  cm. ( $p=0.025$ ) y variante adenocarcinoma ( $p=0.034$ ). La recidiva retroperitoneal fue mayor en estadios II que en estadios III (23.5% frente a 3.7%;  $p=0.047$ ). Las pacientes con HB inicial  $<12$  gr/dl e hidronefrosis presentaron una tendencia no significativa hacia una mayor recidiva retroperitoneal. Ninguno de los factores clínicos analizados tuvo influencia en la recidiva a distancia.

Las supervivencias actuariales libre de recidiva global, pélvica, retroperitoneal y a distancia a 5 años fueron del 48%, 56%, 74% y 85%, respectivamente. La supervivencia



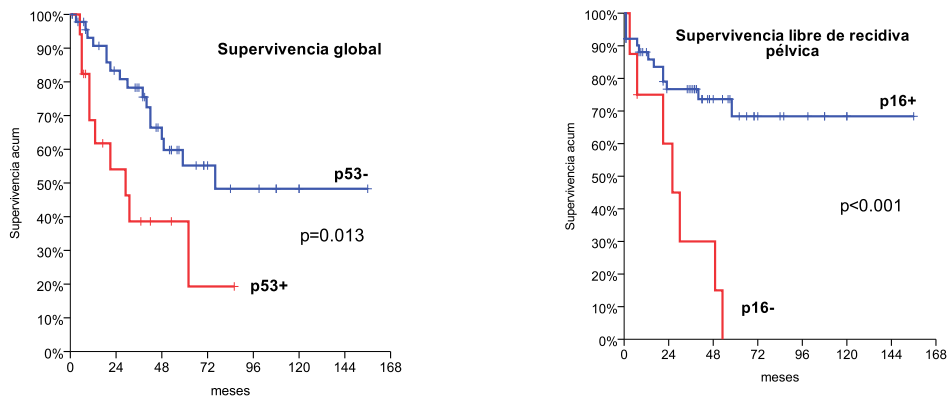


Figura 20: Supervivencia global en función de la p53 (izquierda) y supervivencia libre de recidiva local en función de la p16 (derecha)

libre de recidiva global fue menor en pacientes con hidronefrosis (22% frente a 52%;  $p=0.007$ ); afectación de 1/3 inferior de vagina (0% frente a 57%;  $p=0.003$ ) y tamaño tumoral  $> 4$  cm (91% frente a 40%;  $p=0.012$ ). Las pacientes con adenocarcinoma tuvieron una menor supervivencia libre de recidiva global aunque no hubo diferencias significativas con el epidermoide. Hubo una menor supervivencia libre de recidiva pélvica a 5 años en las pacientes con  $\text{Cr} > 1.2$  gr/dl (33% frente a 56%;  $p=0.046$ ); hidronefrosis (27% frente a 61%;  $p=0.017$ ); infiltración 1/3 inferior de vagina (64% frente a 0%;  $p=0.003$ ); tamaño tumoral  $> 4$  cm (48% frente a 91%;  $p=0.029$ ); e histología de adenocarcinoma (18% frente a 62%;  $p=0.02$ ). La recidiva retroperitoneal fue significativamente mayor en las pacientes con  $\text{Hb} < 12$  gr/dl ( $p=0.036$ ) e hidronefrosis ( $p=0.032$ ); y con tendencia a la significación en tamaño tumoral  $> 4$  cm ( $p=0.08$ ). La supervivencia libre de recidiva a distancia no se vio influida por ninguna variable.

Las pacientes con tumores p16- presentaron una tasa mayor de recidivas que las pacientes con tumores p16+ (87% frente al 35%,  $p=0.004$ ). Esta diferencia se debió, sobre todo, a una mayor tasa de recidiva pélvica en las pacientes p16- (87% frente a 25%,  $p=0.001$ ). Existió también una tendencia no significativa hacia una mayor recidiva local en pacientes con tumores COX2+ comparadas con pacientes con tumores COX2- (50% frente a 27%,  $p=0.087$ ).

Las tasas de recidiva retroperitoneal y a distancia no se vieron influidas por ninguno de los factores moleculares analizados.

El valor de p53 y p16 tuvieron valor pronóstico en la recidiva pélvica. La supervivencia libre de recidiva pélvica a 5 años para los tumores p53- y p53+ fue del 59% frente al 43%, respectivamente ( $p=0.034$ ) y las cifras correspondientes a los tumores p16- y p16+ fueron del 0% frente al 68% ( $p<0.001$ )(Figura 20). El valor pronóstico de la p16 se mantuvo aún cuando se utilizaran otros puntos de corte. La supervivencia libre de recidiva local a 5 años en las pacientes con tumores con  $p16\leq 10\%$  y  $>10\%$  y  $\leq 50\%$  y  $>50\%$  fueron del 74% frente al 0% ( $p=0.000$ ); y del 72% frente al 18% ( $p=0.025$ ).

La expresión de COX2 se asoció a una peor supervivencia libre de recidiva local a 5 años comparada con los tumores COX2- (36% frente a 63%), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ( $p=0.066$ ).

#### ***5.3.4 Supervivencia global, causa-específica y libre de recidiva***

En el momento del análisis 27 p. habían muerto (40%), 20 de ellas por tumor y el resto por causa intercurrente. La supervivencia global y libre de enfermedad medias fueron de 41.7 m. y 40 m., respectivamente. Tuvieron una menor tasa de supervivencia global las pacientes con  $Cr>1.2$  gr/dl (34% frente a 83.3%;  $p=0.034$ ) e hidronefrosis (34.5% frente a 77.8%;  $p=0.025$ ). El resto de factores no tuvieron influencia en la supervivencia,

Las supervivencias actuariales a 5 años global, causa específica y libre de enfermedad fueron de 49%, 63% y 49%, respectivamente. La supervivencia global actuarial a 5 años fue del 45%, para pacientes con  $Cr \leq 1.2$  gr/dl, frente al 17%, en pacientes con  $Cr > 1.2$  gr/dl ( $p=0.016$ ) y del 52% frente al 13% para pacientes sin y con hidronefrosis ( $p=0.01$ ). Hubo una menor supervivencia actuarial causa específica a 5 años en las pacientes con  $Cr > 1.2$  gr/dl (33% frente a 76%;  $p=0.016$ ); hidronefrosis (25% frente a 71%;  $p=0.004$ ); tamaño tumoral  $> 4$  cm (57% frente a 91%;  $p=0.031$ ). La supervivencia libre de enfermedad actuarial a 5 años fue negativamente influida por la afectación de 1/3 inferior de vagina (0% frente a 47%;  $p=0.021$ ); e hidronefrosis (11% frente a 43%;



$p=0.01$ ). El resto de factores no influyeron en supervivencia global, causa específica ni libre de enfermedad.

El único factor molecular con valor pronóstico negativo en supervivencia global fue la positividad de p53 con una supervivencia global a 5 años del 19% frente al 48% para las pacientes con p53- ( $p=0.013$ )(Figura 20). Esta diferencia se mantuvo en supervivencia causa-específica a 5 años (39%, para p53+ frente a 60% para p53-;  $p=0.004$ ). La negatividad de p16 también fue un factor pronóstico adverso para supervivencia, pero solo alcanzó significación estadística en supervivencia libre de enfermedad a 5 años (0% en tumores p16- frente a 42% en tumores p16+;  $p=0.024$ ).

### **5.3.5 Perfil molecular de riesgo**

Agrupando las dos variables más significativas, p53 y p16, se establecieron 2 perfiles moleculares con diferente pronóstico: grupo favorable, constituido por pacientes con tumores p53 negativa y p16 positiva; y grupo desfavorable, con tumores p53 positiva y/o p16 negativa.

La supervivencia actuarial global, causa-específica y libre de enfermedad a 5 años fueron menores en el grupo desfavorable comparadas con el favorable (17% frente a 61%,  $p=0.006$ ; 34% frente a 68%,  $p=0.001$ ; y 11% frente a 49%,  $p=0.004$ , respectivamente (Figura 21).

Se produjeron más recidivas en el grupo desfavorable, principalmente a nivel pélvico. La tasa de recidiva global fue de 65%, en el grupo desfavorable; frente a 27%, en el grupo favorable ( $p=0.003$ ). La diferencia en recidiva global se debe a una mayor tasa de recidiva local en el grupo desfavorable (61% frente a 18%,  $p=0.001$ )(Figura 21). Hubo más recidivas a distancia en el grupo desfavorable, 13% frente a 7%; pero sin alcanzar significación estadística.

La supervivencia libre de recidiva global y local a 5 años para los grupos desfavorable y favorable fueron de 22% frente a 62% ( $p=0.001$ ) y de 24% frente a 73% ( $p<0.001$ ), respectivamente (Figura 21).

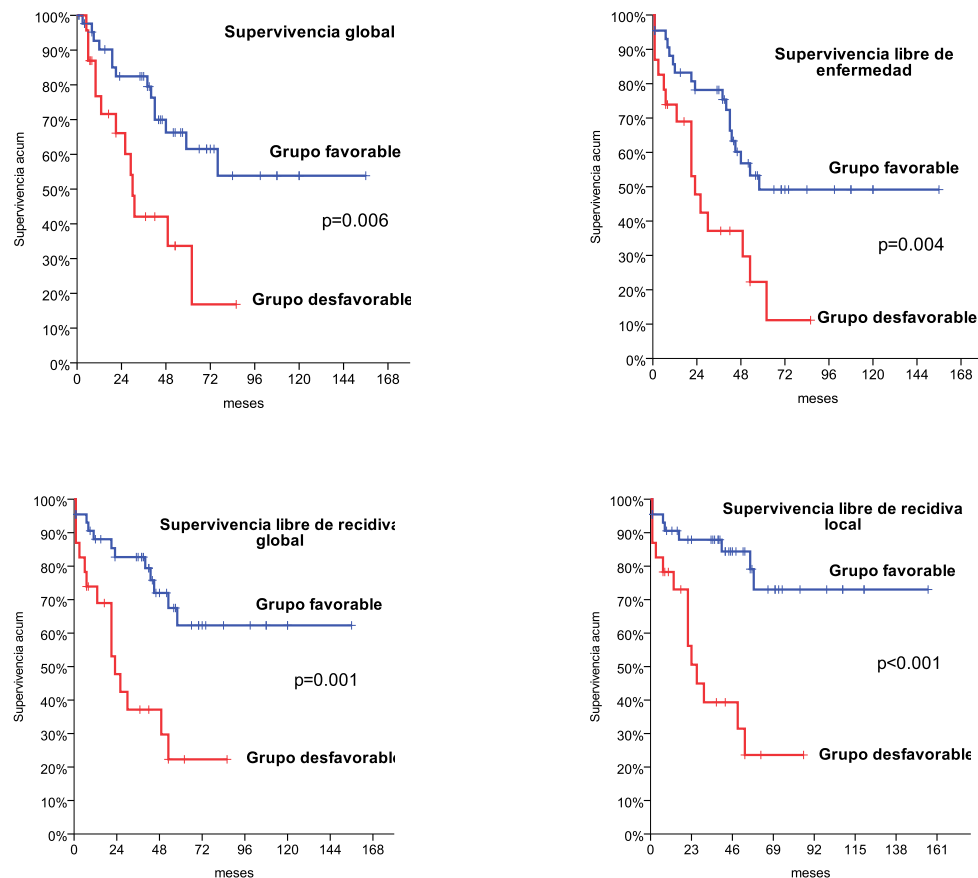


Figura 21: curvas de supervivencia global (arriba izquierda), libre de enfermedad (arriba derecha), libre de recidiva global (abajo izquierda) y libre de recidiva pélvica (abajo derecha), en función del grupo de riesgo: desfavorable (p53 + y/o p16 -) y favorable (p53 - y p16+)

### 5.3.6 Oxigenación tumoral

La media y mediana del número de microvasos fue de 41.95 (6-160) y 30, respectivamente. Para realizar el análisis de ha dividido en 2 grupos tomando como punto de corte la mediana ( $IMVD \leq 30$  y  $IMVD > 30$ ). Ver ejemplos en Figura 22.

No existió correlación entre los niveles de Hb y la IMVD. Los niveles medios de Hb inicial, Hb final y Hb mínima para los grupos de  $IMVD \leq 30$  y  $IMVD > 30$  fueron 12.8 gr/dl frente a 13.1 gr/dl; 12.7 gr/dl frente a 11.9 gr/dl; y 11.4 gr/dl frente a 11.1 gr/dl.

Con respecto a la correlación con otros marcadores, existió una tendencia no significativa hacia una correlación inversa entre la IMVD y el EGFR, observándose que

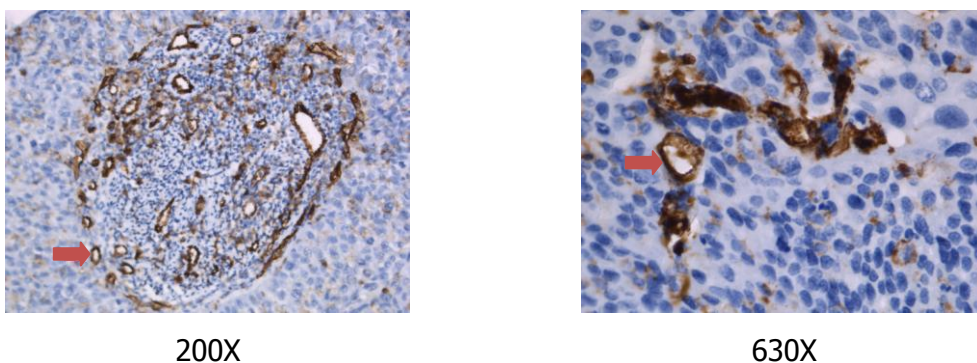


Figura 22: Ejemplos de tinción con anti-CD31 en los que se aprecian los microvasos (flecha roja)

los tumores con EGFR+ presentaron una IMVD  $\leq 30$  en el 72% ( $p=0.07$ ). No se objetivó ninguna correlación con el resto de factores moleculares.

Se observó una correlación significativa entre la IMVD y el estadio: a menor estadio mayor IMVD (IMVD  $> 30$  del 64%, 22% y 20%, para los estadios II, III y IV;  $p=0.005$ ). La IMVD media para los estadios II, III y IV fue de 52.68, 32.3 y 48.2, respectivamente ( $p=NS$ ). Igualmente, el porcentaje de tumores con IMVD $>30$  fue mayor en los tumores  $\leq 4$  cm comparado con los tumores  $>4$  cm (64% frente a 33%,  $p=0.036$ ), aunque no hubo diferencias entre la IMVD media de ambos grupos.

La IMVD media fue similar en las pacientes que recidivaron frente a los que no (42 frente a 42), así como en las pacientes muertas frente a las que no (39 frente a 44).

La supervivencia libre de recidiva pélvica, retroperitoneal y distancia a 5 años para IMVD  $\leq 30$  frente a IMVD  $> 30$  fueron del 62% frente a 62%; 74% frente a 84%; y 89% frente a 89%, respectivamente, sin diferencias significativas entre ambos grupos. Las cifras correspondientes a supervivencia global a 5 años fueron del 50 frente al 47%, sin diferencia significativa entre ambas.

### ***5.3.7 Análisis multivariante del subgrupo con estudio molecular***

Se realizó un análisis multivariante en el subgrupo de pacientes de las que se dispuso de bloque de parafina para la realización de la inmunohistoquímica. Se incluyeron en el mismo las variables significativas o con tendencia a la significación ( $p < 0.1$ ) en el

análisis univariante. Se realizaron 2 análisis: uno en el que se incluyeron los factores moleculares p53 y p16 por separado (Tabla XIII); y, otro, en el que se agruparon estas dos variables en un perfil molecular desfavorable y favorable.

Ningún factor resultó significativo para supervivencia global en el análisis multivariante. Las pacientes con Cr > 1.2 gr/dl (HR: 12.04; p=0.015) y p53 positiva (HR: 4.62; p=0.019) presentaron un mayor riesgo de muerte por enfermedad; al igual que las pacientes con p16 negativa, aunque la diferencia solo presentó una tendencia no significativa (HR: 4.14; p=0.061)(Tabla XIII).

En cuanto a la recidiva, las pacientes con afectación del 1/3 inferior de vagina (HR: 3.98; p=0.036) y p53 positiva (HR: 3.73; p=0.014) tuvieron un mayor riesgo de presentar una recidiva de cualquier tipo. Los factores asociados a un mayor riesgo de recidiva pélvica fueron: Cr > 1.2 gr/dl (HR: 5.68; p=0.047); p53 positiva (HR: 3.98; p=0.032); y p16 negativa (HR: 9.08; p=0.014) (Tabla XIII).

En el segundo análisis de regresión de Cox, las pacientes con perfil molecular desfavorable tuvieron un mayor riesgo de recidiva pélvica (HR: 3,53, IC 95%: 1,09-11,42;p=0 ,035) y de muerte por enfermedad (HR:3,01, IC 95%:1,02-8,88; p=0,046).

Tabla XIII: Análisis multivariante de factores moleculares  
(Modelo 2: subgrupo de pacientes con estudio molecular)

	Hazard ratio	IC 95%	p
<b>Supervivencia global</b>			
Cr > 1.2 gr/dl	2,33	0,62 - 8,74	0,209
Hidronefrosis	1,35	0,37 - 4,91	0,640
p53 positiva	1,89	0,72 - 4,93	0,192
<b>Supervivencia causa específica</b>			
Cr > 1.2 gr/dl	12,04	1,62 - 89,22	0,015
Hidronefrosis	0,24	0,03 - 2,03	0,193
Tamaño > 4 cm.	6,08	0,66 - 55,41	0,109
P53 positiva	4,62	1,29 -16,56	0,019
p16 negativa	4,14	0,93 -18,31	0,061
<b>Supervivencia libre de enfermedad</b>			
Cr > 1.2 gr/dl	2,53	0,67 - 9,45	0,167
Hidronefrosis	1,06	0,27 - 4,13	0,923
1/3 inf. vagina	3,17	0,96 - 10,48	0,058
P53 positiva	1,78	0,68 - 4,67	0,238
p16 negativa	1,43	0,38 - 5,37	0,594
<b>Supervivencia libre de recidiva global</b>			
Hidronefrosis	1,16	0,34 - 3,92	0,807
1/3 inf. vagina	3,98	1,09 - 14,47	0,036
Tamaño > 4 cm.	5,61	0,70 - 44,49	0,102
Adenocarcinoma	0,33	0,06 - 1,74	0,193
P53 positiva	3,73	1,30 - 10,65	0,014
COX2 positiva	1,19	0,40 - 3,51	0,752
p16 negativa	2,64	0,68 - 10,18	0,158
<b>Supervivencia libre de recidiva pélvica</b>			
Cr > 1.2 gr/dl	5,68	1,02 - 31,65	0,047
Hidronefrosis	0,80	0,15 - 4,18	0,795
1/3 inf. vagina	4,82	0,98 - 23,56	0,052
Tamaño > 4 cm.	2,40	0,26 - 21,91	0,437
Adenocarcinoma	0,23	0,02 - 2,17	0,201
P53 positiva	3,98	1,12 - 14,13	0,032
COX2 positiva	1,09	0,29 - 4,04	0,892
p16 negativa	9,08	1,56 - 52,82	0,014

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Estudio clínico

En varios estudios aleatorizados<sup>126-129</sup> se ha demostrado el beneficio de la radioquimioterapia frente al tratamiento con radioterapia exclusiva. Este beneficio se estima en un 6-16% para supervivencia global<sup>130,131</sup> y 12% para supervivencia libre de enfermedad<sup>130</sup>.

Este estudio se realizó en pacientes tratadas antes de la publicación de estos estudios y recibieron el tratamiento estándar en ese momento que era la radioterapia pélvica seguida de braquiterapia endocavitaria. Por tanto, la comparación de los resultados debe hacerse con series de radioterapia exclusiva o con los brazos de radioterapia exclusiva de los estudios de radioquimioterapia mencionados.

La supervivencia global a 5 y 10 años en nuestra serie es del 59% y 43%, respectivamente, cifras comparables a las referidas en la literatura que oscilan entre el 40-66% a 5 años<sup>63, 257</sup> y del 30-55% a 10 años<sup>257</sup>.

#### 6.1.1 Factores pronósticos clínicos

**Estadio:** por estadios, las cifras publicadas en diversas series reportan una supervivencia global a 5 años del 51-85% en estadios II<sup>63,69,71,258,259</sup>; y 41-65% en estadios III<sup>63,69,71,258</sup>. Las cifras correspondientes obtenidas en nuestro estudio para estadios II y III son del 54% y 55%, encontrándose dentro del rango de la literatura. La baja supervivencia en estadios II explica por una alta muerte intercurrente en las 6 pacientes con estadios IIA.

La diseminación a distancia en nuestra serie fue baja afectando solo al 8% de las pacientes, en la mayor parte de los casos combinada con recidiva local. Fagundez et al.<sup>57</sup> en una amplia serie de pacientes tratadas con radioterapia exclusiva refieren una incidencia actuarial a 10 años de diseminación a distancia que oscila entre el 31 – 75% dependiendo del estadio. Una posible explicación a este hecho sería la posible ausencia de estudios de extensión en aquellas pacientes que presentan una recidiva local.

**Afectación ganglionar:** la afectación ganglionar es uno de los factores pronósticos más potentes en cáncer de cérvix referido como tal en más del 91% de las series<sup>78</sup>.

En una serie quirúrgica de pacientes con estadio IB, la supervivencia libre de enfermedad fue del 85.6% frente al 74.4%, para pacientes sin o con metástasis ganglionares<sup>260</sup>.

En un análisis de pacientes incluidas en protocolos del GOG<sup>72</sup>, se objetivó una supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 54%, en pacientes con ganglios negativos; 32%, en pacientes con adenopatías pélvicas; y del 13%, en pacientes con afectación paraórtica. En el análisis multivariante, el riesgo de recidiva y muerte fue significativamente mayor en pacientes con afectación pélvica (RR recidiva: 1.9,  $p=0.0003$ ; RR muerte: 2,  $p=0.0001$ ) y paraórtica (RR recidiva: 11,  $p<0.0001$ ; RR muerte: 6.2,  $p<0.0001$ )<sup>72</sup>. En una serie de pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia<sup>74</sup>, las pacientes con adenopatías mayores de 10 mm en pruebas de imagen presentaron una supervivencia causa-específica a 5 años del 84.9% frente al 58.9% ( $p=0.023$ ) y una supervivencia libre de metástasis a 5 años del 97.4% frente al 61.3% ( $p=0.00023$ ).

Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a recidiva o supervivencia en las pacientes con y sin ganglios positivos al diagnóstico. Dado que este factor ha tenido un fuerte impacto en supervivencia y recidiva en muchas series clínicas, cabe explicar nuestros resultados por el hecho de una baja incidencia de pacientes con N+ (<10%) debido probablemente a la ausencia de estudio de extensión completo en las pacientes mas antiguas.

**Edad:** existe cierta controversia en cuanto al valor pronóstico de la edad, como se ha comentado en la Introducción. Si bien se había publicado que las pacientes más jóvenes tenían peor pronóstico, en series amplias no parece confirmarse este hecho.

En un estudio amplio en 10.022 pacientes encuentran una supervivencia a 5 años mejor en las pacientes menores de 40 años del 69% frente a 45% de las pacientes mayores<sup>62</sup>. Estos mismos resultados han sido confirmados en otro estudio del SEER que tampoco

encuentra diferencias en la supervivencia a 5 años después de ajustar por estadíos y otros factores pronósticos<sup>59</sup>. En la serie del Princess Margaret<sup>63</sup> las pacientes más jóvenes presentaron mejor supervivencia libre de enfermedad a 5 años (57%, 66% y 54% para pacientes <50 años, 50-65 años y >65 años, respectivamente;  $p=0.0015$ ). Otros estudios no confirman la edad joven como factor pronóstico<sup>60</sup>. En pacientes con adenocarcinoma las pacientes jóvenes presentaron una mejor supervivencia causa-específica a 5 años (83%, 69% y 46% en pacientes con edad <35 años, 35-65 años y >65 años, respectivamente;  $p<0.001$ ), pero esta diferencia no se mantuvo en el análisis multivariante<sup>61</sup>.

En nuestra experiencia la edad no influyó ni en supervivencia ni en recidiva, hecho que coincidiría con las series arriba mencionadas que marcan la creencia actual de que la edad no es un factor pronóstico en cáncer de cérvix, siendo posible que en pacientes más jóvenes se acumulen más factores de mal pronóstico, especialmente un mayor índice ki67<sup>64, 65</sup>. Nosotros no encontramos correlación de la edad con ninguno de los factores moleculares analizados.

**Anemia:** en nuestro estudio las pacientes anémicas, definidas como  $Hb < 12$  gr/dl, tuvieron una peor supervivencia global (40% frente a 66%) y causa específica (40% frente a 76%), presentando este factor significación estadística en el análisis univariante. La anemia también fue factor pronóstico negativo para recidiva pélvica y retroperitoneal con significación estadística.

Otros autores publican resultados similares<sup>68-70</sup>. En una serie de pacientes con cáncer de cérvix avanzado tratadas con radioterapia radical, la supervivencia a 3 años fue del 79%, 64% y 32% para niveles de  $Hb \geq 13$  gr/dl, entre 11-13 gr/dl y  $<11$  gr/dl, respectivamente<sup>68</sup>. La tasa de recidiva fue más de 6 veces superior en las pacientes con  $Hb < 11$  gr/dl (10% frente a 65%)<sup>68</sup>. Estos mismos resultados han sido corroborados en otra serie en la que la anemia pretratamiento, considerada como  $Hb < 11$  gr/dl, resultó en una supervivencia a 3 años menor (27% frente a 62%,  $p=0.006$ ), diferencia que se mantuvo en el análisis multivariante<sup>69</sup>. En un amplio estudio retrospectivo multicéntrico que incluyó a 605 pacientes con carcinoma de cérvix estadios II-IV, el



nivel de Hb pretratamiento < 12 gr/dl fue un factor pronóstico desfavorable para supervivencia y control pélvico<sup>70</sup>. En este estudio la supervivencia a 5 años fue del 51% frente al 63% para valores de Hb<12 gr/dl y ≥12 gr/dl, respectivamente ( $p<0.003$ )<sup>70</sup>. En este mismo estudio el nadir de Hb durante el tratamiento también tuvo significación pronóstica con unas cifras de supervivencia a 5 años del 74%, 52% y 45% para un nadires de Hb≥12 gr/dl, Hb entre 11-11.9 gr/dl y Hb<11, respectivamente ( $p<0.0001$ )<sup>70</sup>. Los resultados de estas series coinciden con los obtenidos por nosotros en el análisis univariante, en el que la Hb < 12 gr/dl fue factor de mal pronóstico para supervivencia global ( $p=0.02$ ), causa específica ( $p=0.003$ ), recidiva pélvica (0.01) y recidiva retroperitoneal (0.0004).

El valor pronóstico de la anemia pretratamiento en nuestra serie perdió significación estadística en el análisis multivariante para muerte (HR: 1.29,  $p=0.5$ ) y muerte por enfermedad (HR: 1.81,  $p=0.2$ ), aunque mantuvo una tendencia hacia una mayor recidiva (HR: 2.18,  $p=0.06$ ). Este hecho es debido a que los niveles bajos de Hb estuvieron significativamente asociados a estadios avanzados, mayor tamaño tumoral y presencia de hidronefrosis, lo que le hizo perder significación al realizar el análisis multivariante.

**Subtipo y grado histológico:** en nuestro análisis hemos comparado el grupo de pcientes con histología epidermoide con el grupo de pacientes con adenocarcinoma o sus variantes (células claras, adenoescamoso y *Glassy cell*), encontrando una mejor supervivencia a 5 años libre de enfermedad (58% frente a 22%), de recivia pélvica (66% frente a 31%) y de recidiva a distancia (89% frente a 75%), para la variante epidermoide. Al igual que en nuestra serie, otros autores han reportado un peor control de la enfermedad en pacientes con adenocarcinoma<sup>86-93, 99</sup>; aunque en algunas series quirúrgicas no se ha evidenciado esta diferencia<sup>81-85</sup>.

Oka et al.<sup>99</sup> estudian una serie de pacientes con estadios III tratadas con radioterapia y encuentran una supervivencia a 5 años del 57% en epidermode frente al 27% en adenocarcinoma, sin que existiera diferencias significativas en supervivencia entre los subtipos de adenocarcinomas (20%, en el endocervical y 29% en el adenoescamoso;

p=0.236). No obstante, en un estudio reciente de pares coincidentes la supervivencia a 5 años fue similar en adenocarcinoma y epidermoide (59.9% frente a 61.7%, p=0.101), aunque hubo más remisiones completas en el epidermoide (94.7% frente a 86.5%, p=0.004)<sup>261</sup>.

La peor supervivencia del adenocarcinoma se hace más importante a mayor estadio FIGO<sup>86,92, 93</sup> y mayor tamaño tumoral <sup>86,91</sup>. En la serie de Eifel et al.<sup>86</sup> de pacientes con cáncer de cérvix estadio IB tratadas con radioterapia radical en los tumores >5 cm el riesgo de muerte fue 1.9 veces mayor para el adenocarcinoma, debido sobre todo a una mayor frecuencia de metástasis a distancia. La incidencia de ganglios positivos es mayor en adenocarcinoma (32%) que en el epidermoide (15%)<sup>90</sup>. Dentro de las pacientes con ganglios positivos, aquellas con adenocarcinoma tienen una peor supervivencia que las que tienen un epidermoide (33% frente a 76%, p=0.01)<sup>82</sup>.

En el estudio en fase III GOG-92 que demostró beneficio en control local de la irradiación postoperatoria en pacientes con cáncer de cérvix intervenido quirúrgicamente que presentaban factores de riesgo patológicos, la ventaja fue mayor en las pacientes con adenocarcinoma (recidiva local del 44% , en el grupo control, frente al 9%, en el grupo de irradiación) comparadas con epidermoide (28%, en el grupo control, frente al 20%, en el grupo de irradiación)<sup>262,263</sup>. La administración de quimioterapia concomitante mejora el pronóstico de las pacientes con adenocarcinoma, como se demostró en el estudio fase III de irradiación postoperatoria asociada o no a quimioterapia en pacientes con bordes positivos, parametrios afectados o ganglios positivos<sup>264</sup>. En este estudio, en el brazo sin quimioterapia el adenocarcinoma tuvo peores tasas de supervivencia y control local que el epidermoide; mientras que estas diferencias desaparecieron en el brazo con quimioterapia<sup>264</sup>.

Como se ha mencionado en la Introducción existe la posibilidad de una posible diferencia en el proceso de carcinogénesis y progresión tumoral entre el adenocarcinoma y el epidermoide que podría justificar las diferencias en la evolución clínica de estas dos variedades.

La positividad para HPV es inferior en el adenocarcinoma con cifras del 62% comparado con el 87% y 81% para el escamoso y adenoescamoso, respectivamente<sup>94</sup>. Dentro de los subtipos de adenocarcinomas, el clásico tiene la mayor incidencia con un 71.8% de HPV+, mientras que el endometriode, seroso o células claras no pasan del 30%<sup>27</sup>. El adenocarcinoma presenta una mayor contribución de los subtipos de HPV 16, 18 y 45 que constituyen más del 90% de los casos<sup>27,94,95</sup>.

Se ha descrito un patrón molecular diferente estadísticamente para el adenocarcinoma comparado con el epidermoide consistente en una menor positividad de la p53, CD4, EGFR, CD44 y stratifin asociada a una mayor positividad del c-myc<sup>101</sup>.

La alteración mas frecuentemente descrita es la expression de EGFR en el carcinoma epidermoide. Gaffney et al.<sup>96</sup> encuentran que la única diferencia entre las variantes histológicas fué un increment en la expresión de EGFR en el epidermoide comparado con el adenocarcinoma ( $p = 0.01$ ). Esta misma difreencia se objetuva en otro studio en el que los adenocarcinomas presentaron muy baja frecuencia de EGFR+ (12%) con un OR de positividad del EGFR de 0.19 (0.08-0.47;  $<0.001$ )<sup>97</sup>. En pacientes con estadios IB-IIA tratadas quirúrgicamente la expresión de EGFR también estuvo asociada al carcinoma epidermoide frente a otras variantes (OR: 7.41, 95% CI: 3.38-16.23;  $p < 0.001$ )<sup>98</sup>. En un estudio en pacientes con cáncer de cérvix que evaluó la familia de recptores de tirosín quinasa como factor pronóstico se encontró que la expresión de EGFR se correlacionó con la variante escamosa ( $p=0.05$ ) y la expresión de HER2 con el adenocarcinoma ( $p=0.02$ )<sup>251</sup>. Oka et al.<sup>99</sup> describen una tendencia no significativa a una mayor expresión de EGFR en epidermoide frente al grupo de adenocarcinomas (33% frente a 16%, respectivamente;  $p=0.08$ ); así como una diferencia significativa a una mayor expresión de catepsina D (74% frente a 47%;  $p=0.015$ ).

Baltazar et al.<sup>100</sup> encuentran un patrón molecular diferente entre el carcinoma escamoso y el adenocarcinoma en cuanto a la positividad del EGFR (63.3% frente a 34%, respectivamente;  $p=0.04$ ) y la positividad de COX2 (60% frente a 93.9%, respectivamente;  $p < 0.001$ ). La mayor frecuencia de COX2+ también se demostró en una serie de pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioquimioterapia<sup>102</sup> en la que la

positividad a COX2 fue más frecuente en el adenocarcinoma que en el epidermoide (57% frente a 24%,  $p=0.007$ , respectivamente). Igualmente, Ferrandina et al.<sup>103</sup> encuentra una mayor frecuencia de alto cociente de COX2 tejido/estroma en el adenocarcinoma o adenoescamoso que en el epidermoide (80.6% frente a 40.6%;  $p=0.0013$ ). En otro estudio<sup>104</sup>, la sobreexpresión de COX2 significativa se produjo más frecuentemente en el adenocarcinoma (70.6% frente a 28.6%,  $p=0.004$ ).

Nuestro estudio conforma los resultados de la literatura mencionados más arriba. Hemos podido definir un patrón molecular diferente para los tumores epidermoides y adenocarcinoma y sus variantes. El adenocarcinoma presentó menor positividad de la p16 ( $p=0.004$ ); mayor positividad de COX2 ( $p=0.007$ ); y menor positividad de EGFR, aunque en este último caso no alcanzó significación estadística. La menor positividad de la p16, podría indicar una menor incidencia de infección por HPV en el adenocarcinoma, dado que la p16 se considera un marcador surrogado de esta. Estos resultados concuerdan con los publicados por diversos autores entre los que existe una gran homogeneidad. Por ello confirmamos que el posible peor pronóstico asociado a las histologías no epidermoides, adenocarcinoma y variantes, se debe a la existencia de unas características moleculares que le confieren peor pronóstico.

El grado histológico se ha referido en la literatura como factor pronóstico para recidiva y supervivencia en pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia. Fyles et al.<sup>63</sup> encuentran un mayor riesgo de recidiva o muerte en las pacientes con grado indiferenciado (RR: 1.83,  $p=0.001$ ), aunque este autor lo considera como una variable confundente ya que estuvo ligado al subtipo histológico.

Aunque en nuestro estudio solo pudimos disponer del grado histológico en 58 p., las pacientes con grado 3 presentaron una mayor recidiva pélvica comparada con los grados 1-2. Esta mayor recidiva pélvica se tradujo en una menor supervivencia, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. No encontramos correlación entre el grado histológico y el tamaño o subtipo histológico. No se incluyó este factor en el análisis multivariante dado que se dispuso del mismo en menos de la mitad de los pacientes.

**Tamaño tumoral:** aunque se encuentra íntimamente ligado al estadio, este factor ha sido referido de forma consistente en la literatura como factor pronóstico.

La separación de las pacientes con estadios IB en función del tamaño está reforzada por el valor pronóstico de este último. En pacientes tratadas quirúrgicamente, la supervivencia libre de enfermedad a 5 años fue del 90%, en pacientes con estadios IB1; frente a 72.8%, en pacientes con estadios IB2 ( $p=0.02$ )<sup>76</sup>. Del mismo modo, en una serie de pacientes con estadio IB tratadas con radioterapia el tamaño tumoral fue un potente factor pronóstico, con una supervivencia causa específica a 5 años de 88% para tumores < 5 cm frente a 69%, para un tamaño entre 5-7.9 cm ( $p=0.0001$ )<sup>73</sup>. Perez et al.<sup>77</sup> encuentra igualmente una relación significativa entre tamaño tumoral y recidiva pélvica en pacientes con estadio IB. Las tasas de recidiva pélvica en tumores  $\leq 2$  cm, 2.1 a 5 cm y > 5 cm fue del 5%, 15% y 34%, respectivamente ( $p<0.01$ )<sup>77</sup>.

Toita et al.<sup>74</sup> encuentran una supervivencia causa específica a 5 años de 77.5% frente a 28.6% para tumores menores o mayor/igual a 6 cm ( $p=0.0023$ ). En una serie<sup>75</sup> las pacientes con ganglios positivos o diseminación a distancia presentaron más frecuentemente un tamaño tumoral > 5 cm (67% frente a 36%,  $p=0.01$ ), encontrándose también el tamaño > 5 cm como un factor de mal pronóstico en el análisis multivariante ( $p=0.009$ )<sup>75</sup>.

En un estudio del GOG el valor pronóstico del tamaño tumoral para recidiva se mantuvo de forma lineal por cada centímetro por encima de 2 cm, aunque en el análisis multivariante el factor más significativo fue la positividad de ganglios paraórticos<sup>72</sup>.

Los resultados de la literatura coinciden con los de nuestra serie, en la que las pacientes con tumores > 4 cm tuvieron una peor supervivencia causa específica y libre de enfermedad, así como mayor recidiva pélvica y retroperitoneal. Encontramos una fuerte correlación entre niveles de Hb pretratamiento y tamaño tumoral ( $p=0.002$ ), lo que podría explicarse por una mayor incidencia de sangrado en los tumores grandes. Como era de esperar, demostramos una relación muy significativa entre tamaño tumoral y estadio ( $p < 0,0001$ ). Esta fuerte correlación con otros factores pronósticos hace que, en el análisis multivariante, el tamaño tumoral no alcance significación

estadística ni para recidiva (HR: 3.17,  $p=0.12$ ), ni para muerte por enfermedad (HR: 2.63,  $p=0.21$ ).

**Factores terapéuticos:** las pacientes en nuestra serie han sido tratadas de forma muy homogénea, por lo que no encontramos ninguna diferencia significativa ni en supervivencia ni en recidiva en función de la dosis ni tasa de dosis. La mayor parte de las pacientes fueron tratadas en tiempo, siendo el OTT mediano de 56.7 d. por lo que tampoco este factor resultó pronóstico, incluso cuando se estableció el punto de corte para el análisis en 65 d.

### **6.1.2 Toxicidad**

Al tratarse de un estudio retrospectivo, realizado a partir de las historias clínicas, no se ha analizado la toxicidad aguda dado que esta se encontraba mal reflejada en la historia clínica. Como se ha comentado ampliamente en los apartados de Introducción y Pacientes y Métodos, hemos utilizado el French Italian Glossary (FIG) como escala para la medición de la toxicidad tardía.

Las toxicidades tardías mas frecuentes en nuestra serie fueron la intestinal (28%), vaginal (21%) y urinaria (14%). La toxicidad severa fué infrecuente, presentándose en el 1.4 - 6.5% de las pacientes dependiendo del órgano afecto. Estas cifras se encuentran dentro del rango referido en la literatura que es inferior al 8%<sup>137</sup>.

La toxicidad intestinal se produce en el 5-60% de las pacientes dependiendo del tipo de irradiación, dosis y factores modificadores<sup>134,135</sup>. La toxicidad aguda intestinal grados 3-4 se produce en un 3-25% de las pacientes<sup>134</sup>. La toxicidad aguda es mayor en pacientes tratadas en combinación con quimioterapia<sup>138</sup> y tratamiento radical frente a postoperatorio<sup>265</sup>. Se ha referido que las pacientes mayores tendrían más complicaciones, sin embargo, en un estudio<sup>135</sup> no se objetivaron diferencias en control de la enfermedad ni en toxicidad aguda ni tardía entre las pacientes  $\geq 70$  años. El tratamiento con IMRT disminuye la toxicidad aguda gastrointestinal grado 2 (31.8% frente a 63.6%, respectivamente,  $p=0.034$ ) y grado 3 (4.5% frente a 27.3%, respectivamente;  $p=.047$ )<sup>266</sup>.

La incidencia de complicaciones tardías moderadas/severas ha disminuido sustancialmente yendo desde un 26% en series antiguas<sup>136</sup> hasta < 8% en series modernas<sup>137</sup>. El riesgo actuarial a 5 años de complicaciones tardías a nivel de intestino delgado y de recto es del 4% y 9%, respectivamente<sup>134</sup>. En el estudio aleatorizado mencionado anteriormente<sup>266</sup> que compara irradiación convencional frente IMRT el riesgo de toxicidad intestinal tardía grado  $\geq 2$  fué menor en el brazo de IMRT (13.6% vs 50%,  $P=0.011$ ).

El riesgo actuarial de complicaciones tardías intestinales severas a 5 años en nuestra serie fue del 13%, similar al 9% reportado por otros autores<sup>134</sup>, teniendo en cuenta que nuestras pacientes fueron tratadas todas con técnicas 2D. Como era de esperar, el riesgo de proctitis fue mayor en las pacientes con dosis > 75 Gy en el punto rectal ( $p=0.04$ ) y las tratadas con tasas de dosis > 0.6 Gy/h en punto rectal ( $p=0.016$ ). Cuando realizamos el análisis conjunto de dosis y tasa de dosis (Figura 14) encontramos que el aumento de toxicidad rectal a mayor dosis se produjo solo en las pacientes con tasa de dosis rectal > 0.6 Gy/h. Similares resultados fueron obtenidos por Mazeron et al.<sup>267</sup> en pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados con braquiterapia, en los que la necrosis ósea estuvo relacionada con la dosis y la tasa de dosis, apareciendo la necrosis principalmente en los pacientes tratados con dosis altas y alta tasa de dosis.

En nuestra serie, la incidencia de proctitis fue mayor en las pacientes cuya braquiterapia incluyó cilindros vaginales ( $p=0.03$ ), lo cual es fácilmente explicable dado que el volumen de recto irradiado en estos casos es mucho mayor.

En aquellos centros que usen baja tasa de dosis se debería prestar atención a no sobrepasar las dosis de tolerancia del recto especialmente si la tasa de dosis es superior a 0.6 Gy/h o el implante incluya cilindros vaginales.

La incidencia de toxicidad urológica aguda grados 1-2 tras radioterapia radical está en torno al 15-25%; mientras que la toxicidad aguda severa es < 5%<sup>134,138</sup>. En pacientes tratadas con radioterapia exclusiva, se ha estimado una probabilidad de toxicidad vesical actuarial a 5 años del 3%<sup>134</sup> y un riesgo actuarial a 20 años para complicaciones

tardías grados 3-4 del 6.2%<sup>139</sup>. En los estudios de radioquimioterapia el riesgo de toxicidad urinaria tardía grados 3-4 es menor del 3%<sup>126</sup>.

En nuestro estudio un 15.4% de las pacientes presentaron toxicidad urinaria, si bien la mayoría fueron de grado I. La probabilidad actuarial de complicaciones urinarias severas fue del 5%, cifra muy similar a las mencionadas en la literatura<sup>134,139</sup>.

En el caso de la toxicidad urinaria ni la dosis en punto vesical ni la tasa de dosis resultaron significativas, debido a que la dosis media en vejiga fue de 75 Gy, dentro de los límites de tolerancia. El factor que más influyó en la toxicidad urinaria en nuestras pacientes fue la hidronefrosis, especialmente la toxicidad severa grado III que fue del 38% frente al 2% en las pacientes sin hidronefrosis ( $p=0.0002$ ).

La toxicidad a nivel vaginal, consistente fundamentalmente en estenosis vaginal por fibrosis, produce diversos grados de disfunción sexual en el 50-80% de las pacientes tratadas con braquiterapia<sup>140-144</sup>. Por las características de nuestro estudio no se han realizado encuestas específicas en las pacientes para determinar el grado de disfunción sexual.

La estenosis vaginal moderada/severa se produce en el 1-6% de las pacientes<sup>139,268,269</sup>. En un estudio sueco en pacientes con estadios precoces se encontraron cifras similares de alteración de la función sexual en las pacientes tratadas con cirugía o con radioterapia comparadas con la población normal en lo referente a lubricación insuficiente (RR de 2.8 frente a 1.5); acortamiento vaginal (RR de 6.1 frente a 7.4) y disminución elasticidad (RR de 7.1 frente a 4.5)<sup>144</sup>. La disfunción sexual puede llegar a producir depresión (41%), pérdida de autoestima (32%) y separación matrimonial (26%)<sup>140</sup>.

En nuestro estudio, el 21% de las pacientes presentaron estenosis vaginal de cualquier grado, aunque esta fue completa solo el 2.9% de las pacientes, cifra que se encuentra dentro del rango referido en la literatura<sup>139,268,269</sup>. Ningún factor se asoció de forma significativa a la aparición de estenosis vaginal. Como es sabido, la utilización de dilatadores vaginales disminuye la incidencia de estenosis por lo que esta se



recomendó de forma rutinaria a todas nuestras pacientes; sin embargo, no podemos saber en qué medida se cumplió esta recomendación.

## **6.2 Ensayos predictivos de respuesta**

Con el afán de poder predecir la respuesta de un paciente concreto a la irradiación, durante la década de los 90 se desarrollaron diversos ensayos predictivos dirigidos fundamentalmente a la evaluación de la radiosensibilidad intrínseca y la capacidad proliferativa del tumor<sup>151</sup>. Estos ensayos planteaban problemas metodológicos en relación con el cultivo primario de células tumorales y la técnica de evaluación del Tpot que no fueron plenamente resueltos.

El cultivo de células tumorales plantea dos problemas principales: por un lado, la baja eficiencia de plantaje; y, por otro, la contaminación del cultivo con fibroblastos que proliferan con más facilidad. Los sistemas de cultivo más utilizados en los ensayos predictivos son el clonogénico de Courtenay-Mills<sup>159</sup>, más específico para células tumorales pero más engorroso; y el sistema CAM<sup>158</sup>, más sencillo y rápido pero menos específico.

Para la medición del Tpot, el método de Begg<sup>170</sup> ha sido ampliamente utilizado aunque presenta diversos problemas como la necesidad de inyectar al paciente BrdUrd, la variabilidad intertumoral e intraexperimental, que hace difícil la comparación entre centros.

En dos estudios en pacientes con cáncer de cérvix<sup>159</sup> y cabeza y cuello<sup>162</sup> se demostró una correlación significativa entre la FS2 y el control de la enfermedad; mientras que otros estudios fueron negativos<sup>163-165</sup>. West et al.<sup>159</sup> utilizaron un ensayo clonogénico para determinar la radiosensibilidad intrínseca en pacientes con cáncer de cérvix encontrando una mejor supervivencia a 5 años en las pacientes con una FS2 < 0.4 (80% Vs 50%, p=0.002). Estos resultados no han sido reproducidos por ningún otro grupo.

En nuestro estudio no encontramos correlación entre el valor de las FS2 y el control de la enfermedad, aunque los parámetros obtenidos están dentro del rango descrito en la literatura<sup>270</sup>. En el estudio inmunohistoquímico realizado en las placas de cultivo

hemos observado que la casi totalidad de los cultivos estaban formados por fibroblastos y, por tanto, demostramos que el sistema CAM no es apropiado para el cultivo de células tumorales.

Los estudios de determinación del Tpot se realizaron fundamentalmente en pacientes con cáncer de cabezas y cuello con resultados positivos<sup>271,272</sup>, aunque no concluyentes debido a problemas metodológicos. Tsang et al.<sup>273</sup> realizó mediciones del Tpot en 52 pacientes con cáncer de cérvix, encontrando una tendencia no estadísticamente significativa hacia un peor control local en pacientes con Tpot menores de 5 días. Finalmente, en un amplio trabajo multicéntrico<sup>274</sup> en 476 pacientes con cáncer de cabeza y cuello no se encontró valor predictivo del Tpot, lo que motivó el abandono de esta línea de investigación.

En el grupo de pacientes de nuestra serie en las que se realizó el análisis de cinética tumoral no se encontró correlación significativa entre el Tpot y la supervivencia o recidiva, aunque los valores medios del Tpot fueron menores en los pacientes que recidivaron o murieron de la enfermedad (5.5 d frente a 14 d. en ambos casos). También la supervivencia libre de recidiva pélvica fué mayor en pacientes con Tpot < 6 d. (25% frente al 57%), pero las diferencias tampoco alcanzaron diferencias significativas. Es posible que una mayor inclusión de pacientes hubiera propiciado que se alcanzara significación estadística para el Tpot.

La falta de una evidencia clínica, las dificultades metodológicas y la llegada de las técnicas de biología molecular hicieron que los ensayos predictivos de respuesta se abandonaran a mediados de los años 2000.

### **6.3 Perfiles moleculares de respuesta**

El conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el crecimiento tumoral ha dado lugar en las últimas décadas no solo al desarrollo de las denominadas terapias dirigidas o biológicas, basadas en la modificación de receptores o vías de traducción de señal; sino también a la utilización de perfiles moleculares de respuesta a los diversos tratamientos.

En este estudio se ha investigado un panel de genes implicados en reparación, proliferación y apoptosis, como son p53, EGFR, Ki67, p16 y COX2 cuyos mecanismos de acción se han revisado en la Introducción. Asimismo hemos investigado el papel de la angiogénesis en la respuesta a la radioterapia, mediante la determinación de la IMVD en el tumor.

**EGFR:** aunque existen diversas series que muestran una relación significativa entre la expresión de EGFR y el control de la enfermedad, otras no confirman este hecho por lo que el valor pronóstico de la EGFR no está plenamente definido.

En una serie de 136 pacientes con cáncer de cérvix estadios Ia-IIb<sup>174</sup>, la expresión de EGFR moderada/intensa frente a negativa/débil tuvo un impacto negativo en supervivencia a 5 años (55% frente a 88%,  $p=0.003$ ) y supervivencia libre de enfermedad a 5 años (54% frente al 80%,  $p=0.002$ ). El impacto negativo de la expresión de EGFR se mantuvo en el análisis multivariante, aunque solo para supervivencia (HR: 2.73 95% CI:1.07–6.96;  $p=0.04$ ).

Otro estudio en 55 pacientes tratadas con radioterapia<sup>177</sup> mostró que la expresión membranosa de EGFR se asoció a una peor supervivencia a 5 años (20% frente a 50% para EGFR+ y EGFR-, respectivamente;  $p=0.043$ ). En este trabajo la positividad de EGFR mantuvo significación estadística para supervivencia en el análisis multivariante (HR: 3.53, 95% CI = 1.33–9.41;  $p = 0.012$ )<sup>177</sup>. En una publicación posterior<sup>251</sup>, estos mismos autores encuentran que el EGFR pierde valor pronóstico en el análisis multivariante al ser evaluado de forma conjunta con el resto de miembros de la familia de receptores de tirosín quinasa, manteniendo solo significación estadística la expresión de HER2 (HR: 0.32, IC 98%: 0.1-0.98;  $p=0.05$ ).

Kim et al.<sup>173</sup> en un estudio que evalúa el valor pronóstico de la expresión de EGFR y COX2 describe una peor supervivencia a 5 años en las pacientes con EGFR + (58-82% frente al 100% para EGFR-;  $p=0.009$ ).

Otro estudio en pacientes tratadas con radioterapia<sup>96</sup> confirma el mal pronóstico asociado a positividad de EGFR (supervivencia a 5 años del 20% frente a 50% para

EGFR-;  $p=0.037$ ), el cual se mantuvo en el análisis multivariante (HR: 2.50, 95% IC: 1.24–5.05;  $p=0.011$ ).

En pacientes con EGFR positivo existe una mayor incidencia de recidivas extrapélvicas según un estudio en pacientes con estadio IIb tratadas con radioquimioterapia de Cho et al.<sup>176</sup> el cual observó una incidencia de las mismas del 21% frente al 0%, para EGFR+ y EGFR- respectivamente ( $p=0.03$ ). En este mismo estudio la supervivencia actuarial a 5 años fue del 76% en pacientes con EGFR+ frente al 95% en pacientes con EGFR- ( $p=0.012$ )<sup>176</sup>.

En un amplio estudio<sup>97</sup> de 375 pacientes con estadios Ib-IVa tratadas con radio o radioquimioterapia se demostró que las pacientes con EGFR+ o EGFR fosforilada (pEGFR) tuvieron una mayor incidencia de persistencia o recidiva (EGFR: HR: 1.84; 95% CI: 1.20-2.82;  $p=0.005$ ; pEGFR: HR: 1.71; 95% CI: 1.11-2.66;  $p=0.016$ ). En estas pacientes la supervivencia global actuarial a 5 años para las pacientes con EGFR+ fue del 47% frente al 66% en las pacientes con EGFR- ( $p=0.016$ ), aunque esta diferencia solo tuvo una tendencia no significativa en el análisis multivariante (HR: 1.33; 95% CI: 0.99-1.77;  $p=0.058$ )<sup>97</sup>. La muerte por cáncer sí que fue estadísticamente superior en las pacientes con expresión de EGFR (HR: 1.54; 95% CI: 1.09-2.17;  $p=0.014$ )<sup>97</sup>.

En un estudio en pacientes tratadas con radioterapia, se analizó la expresión de EGFR en combinación con e-cadherina, una molécula de adhesión celular cuya pérdida favorece las metástasis, encontrando que los casos con EGFR- / e-cadherina + tuvieron una mejor supervivencia global a 5 años que los casos EGFR+ / e-cadherina - (60% frente a 12%, respectivamente;  $p=0.02$ )<sup>252</sup>.

Vosmik et al.<sup>178</sup> estudian 72 pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radio o radioquimioterapia encontrando que la intensidad de EGFR se correlacionó con una mayor respuesta tumoral, sin embargo, no tuvo valor pronóstico para supervivencia. Tampoco se encontró significación pronóstica para los valores de EGFR  $\geq 50\%$  en un estudio de 128 pacientes con estadios I-IVA<sup>179</sup>. Yamashita et al.<sup>180</sup> no encuentran valor pronóstico para las pacientes con estadios II-IVA tratadas con radioquimioterapia (supervivencia a 5 años del 52% y 46%, para EGFR+ y EGFR-, respectivamente).

En pacientes con cáncer de cérvix estadio Ib tratadas quirúrgicamente<sup>175</sup> la supervivencia también estuvo relacionada con la expresión de EGFR, existiendo una tendencia no significativa en el análisis multivariante (supervivencia a 5 años del 73% frente al 85% para EGFR+ y EGFR-, respectivamente;  $p=0.07$ ) y un aumento significativo del riesgo de muerte en el análisis multivariante (HR: 3.49, 95% CI: 1.3-9.5;  $p=0.014$ ). Sin embargo, en otra amplia serie de pacientes con estadios IB-IIA tratadas quirúrgicamente<sup>98</sup> no se encontró asociación entre el EGFR y la supervivencia causa específica.

En nuestro estudio hemos encontrado una correlación entre la positividad del EGFR y otros factores clínicos adversos como el estadio ( $p=0.005$ ), tamaño  $> 4$  cm ( $p=0.009$ ) y la histología de adenocarcinoma, aunque en este último caso solo se alcanzó una tendencia no significativa; sin embargo, no encontramos valor pronóstico del EGFR ni para supervivencia ni para recidiva. Estos resultados coinciden con algunas de las series publicadas que tampoco objetivan esta relación. Como posible explicación se encuentra la falta de un criterio uniforme para definir el punto de corte.

**Ki67:** el valor de la determinación de Ki67 está bien establecido en la evaluación de lesiones precancerosas y su riesgo de progresión; sin embargo, su papel como marcador pronóstico no está definitivamente establecido ya que existen algunos resultados contradictorios en la literatura. La mayor parte de estudios han mostrado un papel negativo de la expresión de Ki67<sup>64,186,191</sup>, mientras que en otros está asociada a mejor pronóstico<sup>185,187-189</sup>.

En pacientes con cáncer de cérvix tratado con radioterapia<sup>187</sup> se ha objetivado una mejor supervivencia global actuarial a 5 años en tumores con  $Ki67 \geq 26.4\%$  comparados con los que tenían  $Ki67 < 26.4\%$  (75,8% frente a 59.6%,  $p<0.05$ ).

Oka et al.<sup>190</sup> estudiando pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia no encuentra diferencias en supervivencia global a 5 años entre pacientes con un índice Ki67 mayor o menor del valor mediano (43%). Sin embargo el mismo autor realiza otro trabajo en pacientes tratadas con radioterapia<sup>185</sup> en el que se toman dos muestras: antes del inicio de la radioterapia y a los 9 Gy. Encuentra que el índice de Ki67 se incrementó

desde el 38%, antes de la radioterapia, hasta el 54%, a los 9 Gy<sup>185</sup>. Un bajo índice proliferativo fue un factor de mal pronóstico, estimando las cifras de Ki67  $\leq 40\%$  ó  $>40\%$  a los 9 Gy, para supervivencia global a 5 años (57.8% frente a 77.5%, respectivamente;  $p<0.025$ ); supervivencia libre de enfermedad a 5 años (54% frente a 74.9%, respectivamente;  $p=0.024$ ); y supervivencia libre de metástasis a 5 años (45% frente a 67.5%, respectivamente;  $p=0.045$ )<sup>185</sup>.

Tampoco encuentran valor pronóstico del Ki67 Cole et al.<sup>275</sup> al analizar una serie de pacientes con cáncer de cérvix tratado con radioterapia las cuales presentaron una supervivencia actuarial a 5 años del 57% frente al 62%, para pacientes con Ki67  $>30\%$  y  $<30\%$ , respectivamente ( $p=NS$ )

En pacientes con estadio I tratadas con cirugía<sup>186</sup>, el Ki67 de las pacientes que recidivaron fue del 73.9% frente al 46.9% en aquellas que no presentaron recidiva ( $p=0.007$ ). Altos porcentajes de Ki67 estuvieron asociados al tamaño  $\geq 3$  cm y afectación ganglionar<sup>186</sup>.

En una serie<sup>64</sup>, el 42.6% de las pacientes mostraron positividad en el 30-50% de las células; el 31.1% en  $>50\%$  de las células; y en el 26.2% de los casos la positividad se vio en el 10-30% de las células. Las pacientes con menor expresión de Ki67 presentan una menor tasa de recidiva (37.5%, en Ki67  $\leq 30\%$ , frente a 61.5-63.2%, para Ki67  $>30\%$ ), sin embargo esta correlación no fue estadísticamente significativa, como tampoco lo fue la supervivencia libre de enfermedad<sup>64</sup>.

Se ha reportado<sup>188</sup> niveles de Ki67 mas altos en pacientes sin recidiva frente a las que recidivaron localmente o a distancia (42.3%, 26% y 27.2%,  $p<0.01$ ). En este estudio la supervivencia actuarial a 3 años fue de 90% frente a 38.4% para los pacientes con un Ki67  $\geq 33\%$  o  $<33\%$ , respectivamente ( $p=0.001$ ). El control local también fue superior en el grupo de Ki67  $\geq 33\%$  comparadas con el de Ki67  $>33\%$  (95.5% frente a 65.1%,  $p<0.01$ ), El porcentaje medio de células positivas para Ki67 fue del 36%<sup>188</sup>.

En pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante<sup>189</sup>, el valor de Ki67 fué mas alto en pacientes que respondieron a la QT que además presentaron una mejor supervivencia.

En un metaanálisis<sup>191</sup>, que incluyó 13 series de pacientes con cáncer de cérvix tratadas de forma diversa, se encontró un mayor riesgo de muerte en las pacientes con niveles altos de Ki67 (HR: 1.63. IC95%: 1.09–2.45;  $p < 0.05$ ), si bien no hubo incremento significativo en el riesgo de muerte/recidiva para pacientes con Ki67 elevada (HR:1.26;  $p > 0.05$ ).

El valor medio de Ki67 en nuestra serie fue del 28%, cifra que está dentro del rango referido en la literatura del 26 - 47%<sup>185-188,275</sup>. Al igual que otras series reseñadas mas arriba<sup>187,190,275</sup>, no encontramos cortrelación de los niveles de Ki67 con ninguno de los factores pronósticos clínicos ni tampoco con la supervivencia o recidiva. Aunque en el metaanálisis de Pan et al<sup>191</sup> los niveles alevados de Ki67 presentaron peor supervivencia, algunas series individuales obtiene un resultado opuesto<sup>185,187-189</sup>, con mejor supervivencia en los niveles mas altos de Ki67. Por ello, el valor de la determinación de Ki67 como factor predictivo de respuesta a la radioterapia no está plenamente establecido.

**p53:** la positividad de la p53, con puntos de corte variables según los estudios, se produce en aproximadamente el 28.2-82% de los casos de carcinoma de cérvix<sup>180,193-195,197</sup>, cifras que están ligeramente por encima del 26% obtenido en el presente estudio. Este hecho puede ser debido a un criterio más estricto a la hora de considerar la positividad que, en nuestro caso, fue que existiera tinción de localización nuclear en más del 10% de las células.

En cuanto a la correlación entre la expresión de p53 y la recidiva o supervivencia, la mayor parte de los estudios muestran un valor pronóstico negativo en las pacientes con tumores p53 positivos.

En pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia la positividad de p53 se asoció con una peor supervivencia global a 5 años (42.22% frente a 67.74% en pacientes

con p53 negativa;  $p=0.046$ )<sup>195</sup>. Resultados similares fueron obtenidos por Lindström et al.<sup>101</sup> en una serie de pacientes tratadas con radioterapia con unas cifras de supervivencia a 10 años de 65.8%, en pacientes con p53 negativa, frente al 49%, en p53 positiva ( $p=0.01$ ); aunque esta diferencia no se produjo en la variante de adenocarcinoma. En otro estudio<sup>193</sup>, las pacientes con p53 negativa tuvieron un intervalo libre de progresión mas latgo que las pacientes con p53 elevada (113.9 frente a 60.8 meses). Mega et al.<sup>196</sup> analizan una serie de pacientes con estadios II-IV tratadas con radioterapia y encuentran un riesgo de muerte mayor en pacientes con p53+ en el análisis multivariante (HR: 8.53,  $p=0.023$ ).

Otro estudio<sup>180</sup> en pacientes con estadios II-IVA tratadas con radioquimioterapia, sin embargo, no encontró valor pronóstico para la p53 (supervivencia a 5 años del 48%, en p53 negativa, frente a 51%, en p53 positiva,  $p=NS$ ). La expresión de p53>50% tampoco tuvo valor pronóstico en una serie de pacientes tratadas con radioterapia<sup>198</sup> (supervivencia a 3 años de 62.3% frente a 70% para p53 ≤50% y >50%, respectivamente).

En un estudio en 235 pacientes con estadios I tratadas con cirugía<sup>194</sup>, la expresión de p53 se correlacionó con la afectación parametrial y borde afecto, pero no se encontró valor pronóstico de la misma en el análisis multivariante.

En un metaanálisis reciente<sup>197</sup>, se analizaron 11 publicaciones, que incluyeron 1105 pacientes, en las que se recogía la relación entre la expresión de p53 y supervivencia. El estudio concluye que la expresión de p53 tiene un impacto desfavorable en la supervivencia (HR = 1.672, 95% CI: 1.144–2.444,  $p = 0.008$ ). Esta diferencia se produjo especialmente en el grupo de pacientes caucásicas (HR:1.942)<sup>197</sup>.

Nuestros resultados coinciden con los reportados en la literatura ya que la p53+ conllevó una mayor recidiva pélvica ( $p=0.034$ ) y menor supervivencia global ( $p=0.013$ ). La expresión de p53 fue un factor independiente que no se correlacionó con ningún otro factor pronóstico clínico. Las diferencias en recidiva y supervivencia se mantuvieron en el análisis multivariante observándose un riesgo de muerte por enfermedad 4.62 veces superior en las pacientes con p53 positiva ( $p= 0,019$ ); así como



un mayor riesgo de recidiva global (HR: 3.73,  $p=0.014$ ). La p53, junto con la p16, se ha incluido en el patrón de alto riesgo definido en este estudio.

**COX2:** el porcentaje de pacientes con positividad de COX2 en las diferentes series oscila entre el 30-54.3%<sup>102-104,202, 206</sup>, cifra que está por encima de la observada en nuestro estudio del 23.9%. Esta diferencia es debida a los diferentes puntos de corte usados en las publicaciones, siendo nuestra cifra de positividad del 40.9% si cogemos un punto de corte del 10%.

En nuestro estudio observamos una asociación significativa entre la alta expresión de COX2 y los tumores > 4 cm ( $p=0.02$ ) y, también con la histología de adenocarcinoma (0.007). Otros autores<sup>100,102-104</sup>, han encontrado también una mayor expresión de COX2 en pacientes con adenocarcinoma (discutido mas arriba en el Apartado 6.1.1). En base a nuestros resultados hemos podido definir un perfil molecular característico del adenocarcinoma consistente en alta expresión de COX2 y baja expresión de p16 y EGFR.

Encontramos una correlación directa significativa entre los niveles de COX2 con EGFR ( $p=0.013$ ) y Ki67 ( $p=0.011$ ); e inversa con tendencia a la significación entre COX2 y p16 ( $p=0.06$ ). Este hecho implica la activación de múltiples vías en aquellos tumores más agresivos y confirma, en cierto modo, la validez del patrón de mal pronóstico propuesto en el trabajo. Sin embargo, otros autores han encontrado una relación inversa entre COX2 y EGFR<sup>96</sup>.

Existe unanimidad en las series publicadas<sup>96,102,103,202-207</sup> en cuanto al mal pronóstico de las pacientes con cáncer de cérvix con alta expresión de COX2.

Gaffney et al.<sup>96</sup> analiza pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia determinando diversos factores moleculares y encuentran en el análisis multivariante que la sobreexpresión de COX2 empeoró la supervivencia libre de enfermedad (HR: 1.49,  $p=0.012$ ). La COX2 tuvo una correlación directa con el grado histológico ( $p=0.04$ ) e inversa con el EGFR ( $p=0.02$ )<sup>96</sup>.

Los resultados de un estudio en pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia<sup>206</sup> demuestran la correlación inversa entre la sobreexpresión de COX2 y el índice apoptótico ( $p=0.0002$ ), mientras que no hubo relación con la p53. El índice apoptótico en las tumores COX2 positivos fue menos que en los COX2 negativo (1.6% frente a 2.5%). En este estudio la COX2 solo se relacionó con el estadio clínico, dentro de los parámetros clínicos. Las pacientes con tumores COX2+ frente a los COX2 negativos presentaron una mayor respuesta clínica (80% frente a 59%) y mayor control locoregional a 2 años (96% frente 71.3%), aunque no hubo significación estadística; mientras que la supervivencia causa-específica y la supervivencia libre de metástasis a distancia fueron similares<sup>206</sup>.

Chen et al.<sup>104</sup> encuentran expresión de COX2 en un 41.5% de los tumores, tanto en carcinoma epidermoide como en adenocarcinoma; sin embargo, la sobreexpresión de COX2 significativa se produjo más frecuentemente en el adenocarcinoma (70.6% frente a 28.6%,  $p=0.004$ ). También observan una relación inversa entre expresión de COX2 e infiltración profunda del estroma. La expresión significativa de COX2 fue superior en los casos con infiltración profunda del estroma comparadas con las que no (70% frente a 32.5%,  $p=0.02$ ).

En una serie de pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioquimioterapia<sup>102</sup> la positividad a COX2 fue más frecuente en el adenocarcinoma que en el epidermoide (57% frente a 24%,  $p=0.007$ , respectivamente). También encuentran que las pacientes con COX2 negativa tuvieron un 100% de remisiones completas frente al 83% de pacientes con histología epidermoide y COX2+ y el 67% de pacientes con adenocarcinoma y COX2+ ( $p<0.001$ ). El valor pronóstico de la expresión de COX2 en la tasa de recidiva local se mantuvo tanto en el epidermode (25% para COX2+ frente a 25% para COX2-,  $p=0.007$ ) como en el adenocarcinoma (33% para COX2+ frente a 0% en COX2-,  $p=0.05$ )<sup>102</sup>.

En una serie de pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia,<sup>202</sup> se vio una mayor tasa de control pélvico a 5 años en los tumores con expresión de COX2  $\leq 10\%$  frente a la expresión de COX2  $>10\%$  (92% frente a 42%,  $p=0.005$ ). La diferencia fue aún

mayor en la supervivencia causa-específica a 5 años para los mismos grupos (90% frente al 22%,  $p=0.0003$ , respectivamente)<sup>202</sup>.

En pacientes con estadio IIB de cáncer de cérvix tratadas con radioquimioterapia<sup>203</sup>, la tasa de recidiva fue del 20%, en tumores COX2 negativos; frente al 43%, en pacientes con tumores COX2 positiva ( $p<0.05$ ). Esta diferencia se debe sobre todo a una mayor tasa de recidiva ganglionar (7%, en el grupo COX2 negativo; frente al 38%, en el grupo COX2 positivo.  $p=0.003$ )<sup>203</sup>. El mal control local se reflejó en una peor supervivencia global y libre de enfermedad actuariales a 5 años para tumores COX2 positivo frente a tumores COX2 negativos (56% frente a 94%,  $p=0.0003$ ; y 47% frente a 81%,  $p=0.003$ ). Estos mismos autores no encuentran correlación entre la expresión de COX2 y diversos parámetros clínicos<sup>203</sup>.

En otro trabajo con pacientes tratadas con radioquimioterapia<sup>253</sup>, utilizaron un sistema semiautomático para la cuantificación de la COX2 y examinaron el valor pronóstico del cociente expresión tumor partido por la expresión del estroma, encuentran que los cocientes altos en tumor se asociaron a una peor supervivencia libre de enfermedad. Los resultados de este estudio no son comparables con otros estudios debido a la forma de cuantificación utilizada. Los mismos autores publican otra serie de pacientes tratadas con radioterapia<sup>103</sup>, y encuentran una correlación significativa de altos cocientes de COX2 tumor/estroma con estadios III-IV; histología no epidermoide; y tumores  $\geq 4$  cm. En este estudio los altos niveles del cociente de COX2 tumor/estroma tuvieron una peor supervivencia global a 2 años (61% frente a 90% para bajos niveles,  $p=0.0001$ ), manteniéndose estos resultados en el análisis multivariante<sup>103</sup>.

Kim et al.<sup>173</sup> en un trabajo en el que estudian la coexpresión de EGFR y COX2 encuentran positividad de COX2 en el 28% de los casos, considerando la muestra positiva cuando se teñían más del 10% de las células. Estos autores no encontraron relación del EGFR o COX2 con diversos parámetros clínicos<sup>173</sup>. La recidiva locoregional fue mayor en tumores COX2+, pero solo si el EGFR era también positivo (32% frente a 9%,  $p=0.02$ ). La supervivencia libre de enfermedad actuarial a 5 años fue del 91%. 88%,

69% y 55% para los tumores EGFR-/COX2-, EGFR-/COX2+, EGFR+/COX2- y EGFR+/COX2+, respectivamente<sup>173</sup>.

En un estudio en pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia<sup>207</sup>, se observó que las pacientes con diseminación a distancia tenían un mayor porcentaje de positividad a COX2 frente a las no diseminadas (62% frente a 9%,  $p=0.012$ ).

En pacientes con adenocarcinoma de cérvix, Lee et al.<sup>204</sup> encuentran positividad en el 71.8% de los casos. Al estudiar estos autores la correlación con parámetros clínicos, solo se encontró relación significativa con el estadio clínico ( $p<0.01$ ). Otro hallazgo de este trabajo es la existencia de una relación significativa entre la positividad de COX2 y un alto número de densidad intratumoral de microvasos (MVD). Al igual que en otras series, la supervivencia global fue menor en tumores COX2+ (85% frente a 100%,  $p=0.007$ )<sup>204</sup>.

El valor pronóstico de la COX2 también fue demostrado en otro estudio en pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia<sup>205</sup>. La supervivencia global actuarial a 5 años en pacientes con COX2<10% fue del 75% frente al 35% en pacientes con COX2≥10% ( $p=0.021$ )<sup>205</sup>.

En otro estudio<sup>276</sup> se observó que la positividad de COX2 no tuvo influencia en la supervivencia y solo cuando se analizó la coexpresión de COX2 y EGFR se alcanzó significación estadística para supervivencia (supervivencia actuarial a 5 años del 58% en pacientes con COX2+ o EGFR+, frente al 95% para el resto,  $p=0.002$ ).

Un metaanálisis<sup>208</sup>, que incluyó 23 estudios, demostró que la sobreexpresión de COX2 estuvo asociada a una peor supervivencia (HR: 2.53, IC 95%: 1.54–4.18;  $p < 0.001$ ); peor supervivencia libre de enfermedad (HR: 2.41, IC 95%: 1.58–3.69;  $p < 0.001$ ); y peor respuesta clínica (OR: 3.03, IC 95%: 1.97–4.64;  $p < 0.001$ ). La diferencia en supervivencia se mantuvo en los subgrupos de tratamiento con radioquimioterapia y cirugía. En este estudio también se evidenció una relación significativa entre positividad de COX2 y ganglios positivos (OR: 1.77); tamaño >4 cm (OR: 1.72); estadio III-IV (OR: 2.38); histología no epidermoide (OR: 3.96); y afectación parametrial (OR: 2.45)<sup>208</sup>.

**p16:** un metanálisis de 15 series de pacientes con cáncer de cérvix<sup>220</sup>, muestra una positividad de la p16 del 65% (24-94), aunque los criterios de positividad variaron desde >1% a >50% de las células. En nuestra serie el 86% de los pacientes presentaron p16+ ya que se ha utilizado un punto de corte muy bajo.

En un estudio de la Universidad de Leipzig<sup>217</sup> que analizó 130 especímenes de histerectomía por carcinoma infiltrante de cérvix se encontró una positividad de la p16 en el 83.5% de los casos. La negatividad de la p16 fue un factor de mal pronóstico presentando este grupo de pacientes una supervivencia actuarial a 5 años del 52% frente al 75% para las pacientes con p16 negativa ( $p=0.019$ )<sup>217</sup>.

En pacientes con estadio IB tratadas con cirugía se encontró una peor supervivencia causa específica a 5 años en pacientes con expresión  $\leq 50\%$  de p16 comparada con expresión  $>50\%$  (82% frente a 91%,  $p=0.036$ )<sup>218</sup>. Utilizando como punto de corte la positividad  $> 20\%$ , Wang et al.<sup>193</sup> encuentran un intervalo libre de progresión menor en el grupo p16 negativa (64.2 m. frente a 122.3 m, en p16+;  $p<0.01$ ).

Un estudio en pacientes con cáncer de cérvix estadios IB-IVA tratadas con radioquimioterapia mostró una supervivencia causa-específica a 5 años del 64%, para p16  $>50\%$ , frente al 26%, para p16  $\leq 50\%$  ( $p=0.003$ )<sup>219</sup>. Las cifras correspondientes a supervivencia libre de recidiva fueron de 59% y 23%, respectivamente ( $p=0.0004$ )<sup>219</sup>.

En el metanálisis mencionado más arriba<sup>220</sup>, la positividad de p16 se mostró como un factor de buen pronóstico para supervivencia con un RR de muerte de 0.6 (0.44-0.82;  $p=0.001$ ).

Sin embargo, en pacientes con adenocarcinoma la p16 no parece tener el mismo valor pronóstico. Alfsen et al.<sup>277</sup> estudian 138 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma estadios I-II y encuentran que la expresión de p16 empeora la supervivencia en el análisis multivariante (p16 negativa o baja; HR: 0.16,  $p<0.001$ ), aunque en el análisis univariante no hubo diferencias en la supervivencia a 5 años (80%, en p16 baja, frente a 74% en p16 alta,  $p=0.86$ ). Otro estudio<sup>278</sup> en pacientes con adenocarcinoma tampoco encuentra valor pronóstico de la expresión de p16 para supervivencia.

Nuestro estudio confirma los resultados de la mayor parte de las series en cuanto al mal pronóstico asociado a la negatividad de la p16. Las pacientes de nuestro estudio con p16-, comparadas con p16+, presentaron una mayor tasa de recidiva ( $p=0.004$ ), principalmente recidiva pélvica ( $p=0.001$ ). Estas diferencias se mantuvieron aún cuando se utilizaran otros puntos de corte, lo que indica su consistencia. Este peor control de la enfermedad se tradujo en una peor supervivencia libre de enfermedad para las pacientes con p16- ( $p=0.024$ ), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística para supervivencia global. Este último hecho indica que la p16 se encuentra muy ligada a la respuesta tumoral, sin que hayamos encontrado asociación con otros factores clínicos de mal pronóstico, salvo la histología; ni influencia en la tasa de recidiva a distancia ni retroperitoneal. Dado que la expresión de p16 se considera un marcador surrogado de la infección por HPV, y teniendo en cuenta el papel que esta infección tiene en el cáncer de cabeza y cuello, se podría concluir que la determinación de p16 podría ser un buen factor predictivo de respuesta a la radioterapia.

En el análisis multivariante de nuestras pacientes, se observó un riesgo de muerte por enfermedad de 4.14 para las pacientes con p16- ( $p=0.061$ ). Igualmente la negatividad de p16 se asoció con un mayor riesgo de recidiva pélvica (HR: 9.08;  $p=0.014$ ).

Este factor molecular, junto con la p53, se ha incluido en el perfil molecular de riesgo que se discutirá más abajo.

En definitiva, basándonos en los resultados de nuestra serie y en la literatura se puede afirmar que la determinación de p16 es útil como factor pronóstico y en la predicción de la respuesta al tratamiento.

**Perfil molecular de alto riesgo:** combinando los 2 factores más significativos de nuestro estudio hemos podido definir un perfil de alto riesgo consistente en tumores con p16 negativa o p53 positiva. Este grupo de pacientes tienen una peor supervivencias global ( $p=0.006$ ), supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.004$ ) y recidiva pélvica ( $p<0.001$ ); cuando se las compara con el grupo favorable de pacientes con p16 positiva y p53 negativa. Las pacientes con perfil de alto riesgo tuvieron mayor

riesgo de recidiva pélvica (HR: 3.53) y de muerte por enfermedad (HR: 3.01) en el análisis multivariante.

En nuestro conocimiento es la primera vez que se describe el presente patrón de riesgo en carcinoma de cérvix. Antes de establecer la utilidad de estos marcadores en el ámbito clínico deberían realizarse estudios en pacientes tratadas con radioquimioterapia, si bien muchas de las series comentadas en la Discusión son de pacientes tratadas con radioquimioterapia.

**Oxigenación tumoral:** en nuestro estudio se realizó tinción con Ac anti-CD34 para la evaluación de la vascularización e hipoxia tumoral.

Encontramos una media y mediana de IMVD de 41.8 mv y 30 mv, cifras que se encuentran en el rango referidos en la literatura para cáncer de cérvix de 30-58 mv<sup>248,249</sup>.

El papel de la determinación de la IMVD en pacientes con cáncer no ha sido establecido por la disparidad de los resultados de los pocos estudios publicados y, además, por falta de interés tras la llegada de las pruebas de imagen con marcadores de células hipóxicas de uso más sencillo y que permiten incorporar los resultados en la planificación de radioterapia.

En una revisión de los artículos publicados acerca del valor pronóstico de la IMVD, Hasan et al.<sup>247</sup> encuentran que más del 75% de las series, principalmente de cáncer de mama, mostraron una asociación entre IMVD y resultados clínicos. Sin embargo, en pacientes con cáncer de cérvix el valor pronóstico de la determinación de la IMVD no ha sido claramente demostrado.

En un estudio de pacientes tratadas quirúrgicamente el valor mediano de IMVD fue de 58 mv y existió una correlación significativa de esta con la expresión de timidin fosforilasa<sup>248</sup>. En otro estudio la IMVD no tuvo valor pronóstico en supervivencia libre de enfermedad (63% frente a 81% a 5 años para tumores hipervascularizados frente a hipovascularizados,  $p=NS$ )<sup>248</sup>. Otro trabajo en pacientes con cáncer de cérvix tratadas con cirugía, encuentra un valor mediano de IMVD de 30 mv no existiendo diferencias

en supervivencia entre las pacientes con IMVD < 31 y IMVD > 31, aunque la IMVD estuvo significativamente correlacionada con los valores de la RMN dinámica<sup>249</sup>.

En un estudio realizado en pacientes con cáncer de cérvix avanzado<sup>68</sup> encuentran una mejor supervivencia global a 3 años en las pacientes con una IMVD  $\geq 128$  mv frente a < 128 mv (72% frente a 33%, respectivamente;  $p=0.006$ ); aunque en el análisis multivariante solo mantuvo una tendencia no significativa ( $p=0.06$ ).

Otro estudio en pacientes con cáncer de cérvix tratado con radioterapia exclusiva<sup>279</sup> compara las pacientes con tumores con IMVD>10 con aquellos con IMVD < 10 y encuentra una peor supervivencia a 5 años (50% frente a 65%, respectivamente;  $p=0.038$ ) y un peor control local (62% frente a 80%, respectivamente;  $p=0.028$ ) para los tumores altamente vascularizados. Esta diferencia se mantuvo en el análisis multivariante para supervivencia (RR: 1.8, IC95%: 1.0-3.2;  $p=0.041$ )<sup>279</sup>.

Nosotros no hemos encontrado influencia de la IMVD ni en la recidiva ni en la supervivencia al igual que ocurre en otros estudios<sup>248,249</sup>. La hipoxia tumoral es un fenómeno complejo en el que intervienen múltiples factores y es difícil que la medición de uno de ellos aisladamente tenga utilidad clínica.

Desde un punto de vista teórico, los tumores vascularizados deberían tener una mejor respuesta tanto a la radioterapia como a la quimioterapia; sin embargo, la angiogénesis ha resultado un factor de mal pronóstico en la mayor parte de los estudios. Una posible explicación para esta paradoja sería que la existencia de vasculatura intratumoral no siempre garantiza una adecuada oxigenación del tejido puesto que puede tratarse de vasos aberrantes que, además, suelen estar sometidos a una alta presión intratumoral. Además la existencia de vasos favorece la diseminación a distancia, la cual ha sido asociada a la angiogénesis en muchos estudios. Por todo ello, hoy se considera que la hipoxia tumoral y subsiguiente angiogénesis producen un fenotipo agresivo con activación de múltiples factores de crecimiento que inducen división celular y metástasis.



No hemos encontrado correlación entre los niveles de Hb y la IMVD, como sería de esperar dado que el menor aporte de oxígeno al tumor induciría la formación de nuevos vasos a través de la activación del *hipoxia-inducible factor* (HIF-1) y *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Estas pacientes suelen estar sometidas a una situación de anemia crónica que permite que se produzca una adaptación progresiva sin que se produzca una situación hipóxica, la cual si podría ocurrir en caso de anemia aguda.

Observamos una correlación inversa entre la IMVD y el estadio y tamaño tumoral. Los tumores  $\leq 4$  cm. presentaron más frecuentemente una IMVD  $> 30$  mv ( $p=0.036$ ). Este mismo hallazgo ha sido reportado por otros autores. Cooper et al.<sup>242</sup> encuentran una correlación inversa significativa entre el diámetro tumoral y la hipoxia intratumoral, evaluada mediante el incremento de señal tras la administración de contraste en RMN. Iguales resultados fueron obtenidos en otro estudio que también midió la hipoxia mediante RMN<sup>249</sup>. Una explicación simple sería que el crecimiento rápido tumoral dificulta la formación de nuevos vasos. No obstante, este hallazgo podría ser contradictorio ya que los tumores pequeños a los que se atribuye un mejor pronóstico serían, sin embargo, los que tendrían una mayor vascularización que, a su vez, conlleva mal pronóstico según algunos autores. Por tanto, esta relación inversa entre oxigenación y tamaño tumoral no está plenamente clarificada.

#### **6.4 Limitaciones del estudio**

El estudio se realizó en pacientes diagnosticadas antes del año 2000, período en el el tratamiento estándar era la radioterapia externa mas braquiterapia. Con la publicación de diversos estudios aleatorizados que demostraban un beneficio de la quimioterapia concomitante frente a la radioterapia exclusiva, se estableció como tratamiento para la enfermedad localmente avanzada la radioquimioterapia basada en cisplatino, asociado o no a 5FU, seguida de braquiterapia.

El tratamiento con radioterapia exclusiva se reserva actualmente para pacientes no candidatas a quimioterapia y, por tanto, los resultados de este estudio solo pueden aplicarse a este pequeño grupo de pacientes.

Otra limitación potencial del estudio es su carácter retrospectivo ya que un estudio prospectivo permite realizar un cálculo del tamaño muestral y diseñar un estudio con una fase exploratoria seguida de una fase de validación.

Sin embargo estas limitaciones no invalidan los resultados del estudio que debe ser considerado como un estudio generador de hipótesis que deben ser evaluadas en un diseño prospectivo con el tamaño muestral adecuado para confirmar las conclusiones obtenidas y en pacientes tratadas con radioquimioterapia.

## 7. CONCLUSIONES

- La expresión de p53, p16 y COX2 se correlaciona significativamente con los resultados del tratamiento radioterápico de forma independiente de los factores clínicos por lo que pueden ser utilizados como predictores de respuesta. Hemos podido identificar un patrón molecular de alto riesgo, consistente en p16 negativa o p53 positiva, que permite predecir la respuesta a la radioterapia de estas pacientes.
- La expresión de EGFR se correlaciona con mayor estadio y tamaño tumoral, aunque no tuvo influencia en la supervivencia o recidiva.
- La histología de adenocarcinoma y sus variantes está fuertemente asociada a un patrón molecular consistente en p16 negativa y COX2 positiva, lo que podría justificar su peor pronóstico.
- No hemos encontrado correlación entre la vascularización tumoral, medida como densidad intratumoral de microvasos (IMVD), y el resultado del tratamiento por lo que este parámetro no tiene utilidad en la predicción de respuesta. La IMVD tampoco estuvo relacionada con los niveles de Hb, por lo que esta última tampoco es un buen parámetro de la oxigenación tumoral.
- La FS2 pretratamiento no tuvo relación con el resultado del mismo debido a que el sistema CAM no es adecuado para el cultivo de células tumorales. El Tpot tampoco resultó predictivo de respuesta a la radioterapia. La negatividad de nuestro estudios y otros publicados, junto con la llegada de los perfiles moleculares, hacen que la realización de estos ensayos predictivos no esté justificada hoy día.
- En cuanto a los factores pronósticos clínicos, la Hb < 12 gr/dl, presencia de hidronefrosis y tamaño > 4 cm fueron factores de mal pronóstico para supervivencia global y/o causa específica. Los factores clínicos asociados con una mayor recidiva fueron Hb < 12 gr/dl, presencia de hidronefrosis, tamaño > 4 cm, grado histológico 3 e histología de adenocarcinoma o sus variantes. Ninguno de estos factores mantuvo

significación en el análisis multivariante debido a la fuerte asociación existente entre ellos. Por ello tienen menor capacidad de predicción de respuesta en un paciente individual.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1 - Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- 2 - De Angelis R, Sant M, Coleman MP, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol* 2014; 15:23-34.
- 3 - Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49:1374-403.
- 4 - Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R and Ferlay J eds (2013). *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X* (electronic version) Lyon, IARC. <http://ci5.iarc.fr>
- 5 - Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:2006–2011.
- 6 - Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 2002; 78:225-
- 7 - Narisawa-Saito M, Tohru Kiyono. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 2007; 98:1505–1511.
- 8 - Kuner R, Vogt M, Sultmann H et al. Identification of cellular targets for the human papillomavirus E6 and E7 oncogenes by RNA interference and transcriptome analyses. *J Mol Med* 2007; 85:1253-1262.
- 9 - Muñoz N, M.D., Bosch FX, M.D., de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
- 10 - Brown DR, ShewML, Qadadri B, et al. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 2005; 191:182–192.

- 11 - Winer RL, Lee SK, Hughes JP, et al. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 2005; 157:218–226.
- 12 - Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, et al. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:46–52.
- 13 - Moreno V, Bosch FX, Munoz N, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case–control study. *Lancet* 2002; 359:1085–92.
- 14 - Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case–control study. *Lancet* 2002;359:1093–101.
- 15 – Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. *Int J Cancer* 2014; 135:453–466.
- 16 - Wei L, Griego AM, Chu M and Ozbun MA. Tobacco exposure results in increased E6 and E7 oncogene expression, DNA damage and mutation rates in cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes. *Carcinogenesis* 2014; 35:2373–2381.
- 17 - Anttila T, Saikku P, Koskela P, et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*. 2001; 285:47–51.
- 18 - Smith JS, Herrero R, Bosetti C, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94:1604–1613.
- 19 - Cao S, Gan Y, Dong X and Lu Z. Herpes simplex virus type 2 and the risk of cervical cancer: a meta-analysis of observational studies. *Arch Gynecol Obstet*. 2014; 290:1059–1066.
- 20 - Cramer D, and Cuttler SA. Incidence and histopathology of malignancies of the female genital organs in the United States. *Obstet Gynecol Surv*. 1974; 29:729-731.
- 21 - Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002; 287:2114-2119.
- 22 - Creasman WT. Preinvasive Disease of the Cervix. En: Di Saia PJ and Creasman WT editors. *Clinical Gynecologic Oncology*. 8 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012, p. 1-30.

- 23 - Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993;12:186-92.
- 24 - Petersen O. Spontaneous course of cervical precancerous conditions. *Am J Obstet Gynecol*. 1956; 72:1063–1071.
- 25 - Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, et al. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 1998; 92:727–735.
- 26 - Tavassoli FA, Devilee P, editors. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2003.
- 27 - Pirog EC, Lloveras B, Molijn A, et al. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. *Modern Pathology* 2014; 27:1559–1567.
- 28 - Pimenta JM, Galindo C, Jenkins D, and Taylor SM. Estimate of the global burden of cervical adenocarcinoma and potential impact of prophylactic human papillomavirus vaccination. *BMC Cancer*. 2013; 13:553.
- 29 - Tamimi HK, Ek M, Hesla J, et al. Glassy cell carcinoma of the cervix redefined. *Obstet Gynecol*. 1988; 71:837-41.
- 30 - Grayson W, Taylor LF, Cooper K, et al. Adenoid cystic and adenoid basal carcinoma of the uterine cervix: comparative morphologic, mucin, and immunohistochemical profile of two rare neoplasms of putative 'reserve cell' origin. *Am J Surg Pathol*. 1999; 23:448-58.
- 31 - Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*. 1999;49:8.
- 32 - Peto J, Gilham C, Fletcher O, and Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet* 2004;364:249-56.
- 33 - Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin*. 2012; 62:147-72.
- 34 - Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;105:107-8.
- 35 - Bipat S, Glas AS, van der Velden J, et al. Computed tomography and magnetic resonance imaging in staging of uterine cervical carcinoma: a systematic review. *Gynecol Oncol* 2003; 91:59–66.

- 36 - Hricak H, Gatsonis C, Chi DS, et al. Role of imaging in pretreatment evaluation of early invasive cervical cancer: results of the intergroup study American College of Radiology Imaging Network 6651- Gynecologic Oncology Group 183. *J Clin Oncol* 2005; 23:9329-37.
- 37 - Miller TR, Pinkus E, Dehdashti F, and Grigsby PW. Improved prognostic value of 18F-FDG PET using a simple visual analysis of tumor characteristics in patients with cervical cancer. *J Nucl Med* 2003; 44:192-7.
- 38 - Loft A, Berthelsen AK, Roed H, Ottosen C, et al. The diagnostic value of PET/CT scanning in patients with cervical cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol* 2007; 106:29-34.
- 39 - Chung JJ, Kim MJ, Cho NH, et al. T2-weighted fast spinecho MR findings of adenocarcinoma of the uterine cervix: comparison with squamous cell carcinoma. *Yonsei Med J* 1999; 40:226-31.
- 40 - Liang CC, Tseng CJ, Soong YK. The usefulness of cystoscopy in the staging of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 76:200-3.
- 41 - Yang WT, Lam WW, Yu MY, et al.. Comparison of dynamic helical CT and dynamic MR imaging in the evaluation of pelvic lymph nodes in cervical carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 175:759-66.
- 42 - Lin WC, Hung YC, Yeh LS, et al.. Usefulness of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography to detect paraaortic lymph nodal metastasis in advanced cervical cancer with negative computed tomography findings. *Gynecol Oncol* 2003; 89:73-6.
- 43 - Grigsby PW, Siegel BA, Dehdashti F. Lymph node staging by positron emission tomography in patients with carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 2001; 19:3745-9.
- 44 - Hertel H, Kohler C, Elhawary T, et al. Laparoscopic staging compared with imaging techniques in the staging of advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 87:46-51.
- 45 - Ramirez PT, Jhingran A, Macapinlac HA, et al. Laparoscopic extraperitoneal para-aortic lymphadenectomy in locally advanced cervical cancer: a prospective correlation of surgical findings with positron emission tomography/computed tomography findings. *Cancer* 2011; 117:1928-34.
- 46 - Marnitz S, Kohler C, Roth C, et al.. Is there a benefit of pretreatment laparoscopic transperitoneal surgical staging in patients with advanced cervical cancer? *Gynecol Oncol* 2005; 99:536-44.



- 47 - Gold MA, Tian C, Whitney CW, et al. Surgical versus radiographic determination of para-aortic lymph node metastases before chemoradiation for locally advanced cervical carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 2008; 112:1954–63.
- 48 - Landoni F, Maneo A, Colombo A, et al. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet* 1997;350:535–540.
- 49 - Perez CA, Camel HM, Askin F, et al. Endometrial extension of carcinoma of the uterine cervix: a prognostic factor that may modify staging. *Cancer* 1981; 48:170–180.
- 50 - Chao KSC, Grigsby PW, Mutch D, et al. Prognostic factors for distant metastasis in carcinoma of the cervix with endometrial extension. *J Brachyther Int* 2000;16:181–186.
- 51 - Creasman WT, Soper JT, Clarke-Pearson D. Radical hysterectomy as therapy for early carcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155:964–969.
- 52 - Samlal RA, van der Velden J, Ten Kate FJ, et al. Surgical pathologic factors that predict recurrence in stage IB and IIA cervical carcinoma patients with negative pelvic lymph nodes. *Cancer* 1997; 80:1234–1240.
- 53 - Benedetti-Panici P, Maneschi F, Scambia G, et al. Lymphatic spread of cervical cancer: an anatomical and pathological study based on 225 radical hysterectomies with systematic pelvic and aortic lymphadenectomy. *Gynecol Oncol* 1996; 62:19–24.
- 54 - Berman ML, Keys H, Creasman W, et al. Survival and patterns of recurrence in cervical cancer metastatic to periaortic lymph nodes (a Gynecologic Oncology Group study). *Gynecol Oncol* 1984;19:8–16.
- 55 - Lagasse LD, Creasman WT, Shingleton HM, et al. Results and complications of operative staging in cervical cancer: experience of the Gynecologic Oncology Group. *Gynecol Oncol* 1980; 9:90–98.
- 56 - Girardi F, Lichtenegger W, Tamussino K, et al. The importance of parametrial lymph nodes in the treatment of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1989; 34:206–211.
- 57 - Fagundes H, Perez CA, Grigsby PW, et al. Distant metastases after irradiation alone in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24:197–204.
- 58 - Dattoli MJ, Gretz HF 3rd, Beller U, et al. Analysis of multiple prognostic factors in patients with stage IB cervical cancer: age as a major determinant. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17:41–47.
- 59 - Brewster WR, DiSaia PJ, Monk BJ, et al. Young age as a prognostic factor in cervical cancer: results of a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180:1464-7.

- 60 - Spanos WJ Jr1, King A, Keeney E, et al. Age as a prognostic factor in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*. 1989; 35:66-8.
- 61 - Baalbergen A, Ewing-Graham PC, Hop WC, et al. Prognostic factors in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2004; 92:262-7.
- 62 - Meanwell CA, Kelly KA, Wilson S, et al. Young age as a prognostic factor in cervical cancer: analysis of population based data from 10,022 cases. *Br Med J*. 1988; 296:386–391.
- 63 - Fyles AW, Pintilie M, Kirkbride P, et al. Prognostic factors in patients with cervix cancer treated by radiation therapy: results of a multiple regression analysis. *Radiother Oncol* 1995; 35:107–117.
- 64 - Ancuța E, Ancuța C, Cozma LG, et al. Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferation factor and E-cadherin expression. *Rom J Morphol Embryol* 2009; 50:413-8.
- 65 - Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, et al. MIB 1 immunostaining in cervical carcinoma of young patients. *Gynecol Oncol* 1997; 67:184-7.
- 66 - Hirst D. Anemia: a problem or an opportunity in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12:2009–2017.
- 67 - Fyles AW, Milosevic M, Pintilie M, et al. Anemia, hypoxia and transfusión in patients with cervix cancer: a review. *Radiother Oncol* 2000; 57:13–19.
- 68 - Dunst J, Kuhnt T, Strauss HG, et al. Anemia in cervical cancers: impact on survival, patterns of relapse, and association with hypoxia and angiogenesis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003; 56:778-87.
- 69 - Haensgen G, Krause U, Becker A, et al. Tumor hypoxia, p53, and prognosis in cervical cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 50:865-72.
- 70 - Grogan M, Thomas GM, Melamed I, et al. The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Cancer*. 1999; 86:1528-36.
- 71 - Perez CA1, Grigsby PW, Nene SM, et al. Effect of tumor size on the prognosis of carcinoma of the uterine cervix treated with irradiation alone. *Cancer*. 1992; 69: 2796-806.
- 72 - Stehman FB, Bundy BN, DiSaia PH, et al. Carcinoma of the cervix treated with irradiation therapy. I. A multi-variate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 1991; 67:2776–2785.

- 73 - Eifel PJ, Morris M, Wharton JT, et al. The influence of tumor size and morphology on the outcome of patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994; 29:9-16.
- 74 - Toita T, Nakano M, Higashi M, et al. Prognostic value of cervical size and pelvic lymph node status assessed by computed tomography for patients with uterine cervical cancer treated by radical radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;33: 843-9.
- 75 - Pitson G, Fyles A, Milosevic M, et al. Tumor size and oxygenation are independent predictors of nodal disease in patients with cervix cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51:699–703.
- 76 - Finan MA, DeCesare S, Fiorica JV, et al. Radical hysterectomy for stage IB1 vs IB2 carcinoma of the cervix: does the new staging system predict morbidity and survival? *Gynecol Oncol* 1996; 62:139–147.
- 77 - Perez CA, Grigsby PW, Chao KSC, et al. Tumor size, irradiation dose, and long-term outcome of carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41:307–317.
- 78 - Creasman WT1, Kohler MF. Is lymph vascular space involvement an independent prognostic factor in early cervical cancer? *Gynecol Oncol*. 2004; 92:525-9.
- 79 - Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, et al. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. *Cancer* 2004; 100:1035–44.
- 80 - Sherman ME, WangSS, Carreon J, et al. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. *Cancer* 2005; 103:1258–64.
- 81 - Grigsby PW, Perez CA, Kuske RR, et al. Adenocarcinoma of the uterine cervix: lack of evidence for a poor prognosis. *Radiother Oncol* 1988; 12:289–96.
- 82 - Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A, et al. Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell carcinoma of the cervix? *Cancer* 1995; 76:1948–55.
- 83 - Kilgore LC, Soong SJ, Gore H, et al. Analysis of prognostic features in adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1998; 31:137–48.
- 84 - Alfsen GC, Kristensen GB, Skovlund E, et al. Histologic subtype has minor importance for overall survival in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: a

population-based study of prognostic factors in 505 patients with nonsquamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer* 2001;92:2471–83.

85 - Lee KBM, Lee JM, Park CY, et al. What is the difference between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix? A matched case-control study. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:1569–73.

86 - Eifel PJ, Burke TW, Morris M, et al. Adenocarcinoma as an independent risk factor for disease recurrence in patients with stage 1B cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 59:38–44.

87 - Kleine W, Rau K, Schwoerer D, Pfleiderer A. Prognosis of adenocarcinoma of the cervix uteri: a comparative study. *Gynecol Oncol* 1989; 35:145–59.

88 - Davy MLJ, Dodd TJ, Luke CJ, Roder DM. Cervical cancer: effect of glandular cell type on prognosis, treatment, and survival. *Obstet Gynecol*. 2003; 101:38–45.

89 - Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, Okamoto K, Kuwabara M, Negishi H, et al. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002; 81:1144–51.

90 - Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, Itamochi H, Sato S, Akeshima R, et al. Prognosis and clinicopathological characteristics of Ib-IIb adenocarcinoma of the uterine cervix in patients who have had radical hysterectomy. *Eur J Surg Oncol*. 2000;26: 464–7.

91 - Nakanishi T, Ishikawa H, Suzuki Y, Inoue T, Nakamura S, Kuzuya K. A comparison of prognoses of pathologic stage IB adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2000; 79:289–93.

92 - Chen RJ, Lin YH, Chen CA, Huang SC, Chow SN, Hsieh CY. Influence of histologic type and age on survival rates for invasive cervical carcinoma in Taiwan. *Gynecol Oncol* 1999;73:184–90.

93 - Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol*. 1991; 77:912–7.

94 - de Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective crosssectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010; 11:1048–56.

95 - Tjalma WA, Fiander A, Reich O, et al. Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int J Cancer* 2013; 132:854–67.

- 96 - Gaffney DK1, Haslam D, Tsodikov A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56:922-8.
- 97 - Noordhuis MG, Eijnsink JJ, Ten Hoor KA et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo) radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:7389–7397.
- 98 - Eijnsink JJ, Noordhuis MG, Hoor KA, et al. The epidermal growth factor receptor pathway in relation to pelvic lymph node metastasis and survival in early stage cervical cancer. *Human Pathology* 2010; 41:1735–1741.
- 99 - Oka K, Nakano T and Arai T. Expression of cathepsin D and epidermal growth factor in stage III cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*, 1997; 7:122-126.
- 100 - Baltazar F, Filho AL, Pinheiro C, et al. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor expressions in different histological subtypes of cervical carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26:235-41.
- 101 - Lindström AK, Tot T, et al.. Discrepancies in expression and prognostic value of tumor markers in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in cervical cancer. *Anticancer Res* 2009; 29:2577-8.
- 102 - Kim YB, Kim GE, Pyo HR, et al. Differential cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60:822-9.
- 103 - Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, et al. Prognostic role of the ratio between cyclooxygenase-2 in tumor and stroma compartments in cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3117-23.
- 104 - Chen YJ, Wang LS, Wang PH, et al. High cyclooxygenase-2 expression in cervical adenocarcinomas. *Gynecol Oncol.* 2003; 88:379-85.
- 105 - Maruo T, Shibata K, Kimura A, et al.. Tumor associated antigen, TA-4, in the monitoring of the effects of therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Serial determinations and tissue localization. *Cancer* 1985; 56:302-8.
- 106 - Gaarenstroom KN, Kenter GG, Bonfrer JM, et al. Can initial serum cyfra 21-1, SCC antigen, and TPA. levels in squamous cell cervical cancer predict lymph node metastases. or prognosis? *Gynecol Oncol* 2000; 77:164-70.

- 107 - Duk JM, Groenier KH, de Bruijn HW, et al. Pretreatment serum squamous cell carcinoma antigen: a newly identified prognostic factor in early-stage cervical carcinoma. *J Clin Oncol* 1996; 14:111–118.
- 108 - Strauss HG, Laban C, Lautenschlager C, et al. SCC antigen in the serum as an independent prognostic factor in operable squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Cancer* 2002; 38:1987–1991.
- 109 - Reesink-Peters N, van der Velden J, Ten Hoor KA, et al. Preoperative serum squamous cell carcinoma antigen levels in clinical decision making for patients with early-stage cervical cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:1455–1462.
- 110 - Hong JH, Tsai CS, Chang JT, et al. The prognostic significance of pre- and posttreatment SCC levels in patients with squamous cell carcinoma of the cervix treated by radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41:823–830.
- 111 - An JJ, Lee YY, Park JY, et al. Prognostic value of pre-treatment SCC-Ag level in patients with cervical cancer. *Korean J Obstet Gynecol* 2011; 54:428–434.
- 112 - Gadducci A, Tana R, Fanucchi A, Genazzani AR. Biochemical prognostic factors and risk of relapses in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 107:S23–S26.
- 113 - Chan YM, Ng TY, Ngan HY, et al. Monitoring of serum squamous cell carcinoma antigen levels in invasive cervical cancer: is it cost-effective? *Gynecol Oncol* 2002; 84:7.
- 114 - Potish RA, Downey GO, Adcock LL, et al. The role of surgical debulking in cancer of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17:979–984.
- 115 - Inoue T, Morita K. Long-term observation of patients treated by postoperative extendedfield irradiation for nodal metastases from cervical carcinoma stages IB, IIA, and IIB. *Gynecol Oncol* 1995; 58:4–10.
- 116 - Portelance L, Chao KS, Grigsby PW, et al. Intensity-modulated radiation therapy (IMRT) reduces small bowel, rectum, and bladder doses in patients with cervical cancer receiving pelvic and para-aortic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:261–266.
- 117 - Romero J, Hervás A y Sáez J. Cáncer de cérvix. En: Volúmenes blanco en radioterapia conformada 3D. Editor: Pilar Samper. Madrid. Visto Bueno Equipo Creativo, 2010,pág: 105-118.
- 118 - International Commission on Radiation Units and measurements. Prescribing, recording and reporting photon beam therapy. Supplement to ICRU 50. ICRU report 62, 1999.

- 119 - International Commission on Radiation Units and Measurements. Dose and volume specification for reporting intracavitary therapy in gynecology. ICRU 38, 1985.
- 120 - Wang X, Liu R, Ma B, et al. High dose rate versus low dose rate intracavity brachytherapy for locally advanced uterine cervix cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(7):CD007563.
- 121 - Viswanathan AN, Thomadsen B. American Brachytherapy Society consensus guidelines for locally advanced carcinoma of the cervix. Part I: General principles. *Brachytherapy* 2012; 11:33–46.
- 122 - Viswanathan AN, Beriwal S, De Los Santos JF, et al. American Brachytherapy Society consensus guidelines for locally advanced carcinoma of the cervix. Part II: High-dose-rate brachytherapy. *Brachytherapy* 2012;11:47–52.
- 123 - Lee LJ, Das IJ, Higgins SA, et al. American Brachytherapy Society consensus guidelines for locally advanced carcinoma of the cervix. Part III: Low-dose-rate and pulsed-dose-rate brachytherapy. *Brachytherapy* 2012; 11:53–57.
- 124 - Tod MC, Meredith WJ. A dosage system for use in the treatment of cancer of the uterine cervix. *Br J Radiol* 1938; 11:809–824.
- 125 - Haie-Meder C, Potter R, Van Limbergen E, et al. Recommendations from Gynaecological (GYN) GEC-ESTRO Working Group (I): concepts and terms in 3D image based 3D treatment planning in cervix cancer brachytherapy with emphasis on MRI assessment of GTV and CTV. *Radiother Oncol* 2005; 74:235–245.
- 126 - Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer *N Engl J Med* 1999; 340:1137–1143.
- 127 - Whitney CW, Sause W, Bundy BN, et al. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1999; 17:1339–1348.
- 128 - Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340:1144–1153.
- 129 - Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 1154–1161.

- 130 - Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, et al. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2001; 358:781-6.
- 131 - Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008; 26:5802-12.
- 132 - Chassagne D, Sismondi P, Horiot JC, et al. A glossary for reporting complications of treatment in gynecological cancers. *Radiother Oncol* 1993; 26:195-202.
- 133 - Romero J. Bases biológicas de la toxicidad en tejidos sanos de la combinación radioquimioterapia. *Oncología* 2005; 28:17-19-
- 134 - Pedersen D, Bentzen SM, Overgaard J. Early and late radiotherapeutic morbidity in 442 consecutive patients with locally advanced carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 941–952.
- 135 - Mitchell PA, Waggoner S, Rotmensch J, et al. Cervical cancer in the elderly treated with radiation therapy. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 291–298.
- 136 - Rodrigus P, De Winter K, Leers WH, et al. Late radiotherapeutic morbidity in patients with carcinoma of the uterine cervix: the application of the French–Italian glossary. *Radiother Oncol* 1996; 40: 153–157.
- 137 - Pearcey R, Brundage M, Drouin P, et al. Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2002; 20:966–972.
- 138 - Kirwan JM, Symonds P, Green JA, et al. A systematic review of acute and late toxicity of concomitant chemoradiation for cervical cancer. *Radiother Oncol*. 2003; 68:217-26.
- 139 - Eifel PJ, Levenback C, Wharton JT, et al. Time course and incidence of late complications in patients treated with radiation therapy for FIGO stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32: 1289–1300.
- 140 - Grigsby PW, Russell A, Bruner D, et al. Late injury of cancer therapy on the female reproductive tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 1281–1299.
- 141 - Flay LD, Matthews JH. The effects of radiotherapy and surgery on the sexual function of women treated for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 399–404.



- 142 - Cull A, Cowie VJ, Farquharson DI, et al. Early stage cervical cancer: psychosocial and sexual outcomes of treatment. *Br J Cancer* 1993; 68:1216–1220.
- 143 - Bertelsen K. Sexual dysfunction after treatment of cervical cancer. *Dan Med Bull* 1983; 30: 31–34.
- 144 - Bergmark K, Avall-Lundqvist E, Dickman PW, et al. Vaginal changes and sexuality in women with a history of cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340: 1383–1389.
- 145 - Grigsby PW, Roberts HL, Perez CA. Femoral neck fracture following groin irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32: 63–67.
- 146 - Konski A, Sowers M. Pelvic fractures following irradiation for endometrial carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 35: 361–367.
- 147 - Tai P, Hammond A, Dyk JV, et al. Pelvic fractures following irradiation of endometrial and vaginal cancers – a case series and review of literature. *Radiother Oncol* 2000; 56:23–28.
- 148 - Blomlie V, Rofstad EK, Talle K, et al.. Incidence of radiation-induced insufficiency fractures of the female pelvis: evaluation with MR imaging. *Am J Roentgenol* 1996; 167: 1205–1210.
- 149 - Oh D, Huh SJ, Nam H, et al. Pelvic insufficiency fracture after pelvic radiotherapy for cervical cancer: analysis of risk factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70:1183.
- 150 - Bliss P, Parsons CA, Blake PR. Incidence and possible aetiological factors in the development of pelvic insufficiency fractures following radical radiotherapy. *Br J Radiol* 1996; 69:548.
- 151 - Romero J. Ensayos predictivos de respuesta a la radioterapia: revisión de la literatura. *Oncología* 1996; 19:559-570.
- 152 - Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1981; 7:621-629.
- 153 - Whithers HM, Taylor JMG, Maciejewski M. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 1988; 27:131-145.
- 154 - Fertil B, Malaise EP. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 unpublished curves. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1985; 11:1699-1707.

- 155 - Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 1984; 2:317-323.
- 156 - Paterson RP. The radical x-ray treatment of the carcinomata. *Br. J. Radiol.* 1936; 9:671-676.
- 157 - Romero J, de la Torre A, Ramón y Cajal S, et al.. Sistemas experimentales en radiobiología: métodos de evaluación de radiosensibilidad in vitro. *Radioprotección* 1994; 1:14-20.
- 158 - Baker F, Spitzer G, Ajani JA, et al.. Drug and radiation sensitivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor cells using cell adhesive matrix and supplemented medium. *Cancer Res* 1986; 43:1263-1274.
- 159 - West CML, Davidson SE, Robert SA, Hunter RD. Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Br. J. Cancer.* 1993; 68:819-823.
- 160 - West CML, Davidson SE, Burt PA, Hunter RD. The intrinsic radiosensitivity of cervical carcinoma: correlations with clinical data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995; 31:841-846.
- 161 - Girinski T, Lubin R, Pignon JP, Chavaudra N, Gazeau J, Dubray B, Cosset JM, Socie G, Fertil B. Predictive value of in vitro radiosensitivity parameters in head and neck and cervical carcinomas: preliminary correlations with local control and overall survival. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993; 25:3-7.
- 162 - Girinsky T, Bernheim A, Lubin R, Tavakoli-Razavi T, Baker F, Janot F, Wibault P, Coset JM, Duvallard P, Duverger A, Fertil B. In vitro parameters and treatment outcome in head and neck cancers treated with surgery and/or radiation: cell characterization and correlations with local control and overall survival. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994; 30:789-794.
- 163 - Taghian A, Ramsay J, Allalunis-Turner J, Budach W, Gioioso D, Pardo F, Okunieff P, Bleehen N, Urtasum R, Suit H. Intrinsic radiation sensitivity may not be the major determinant of the poor clinical outcome of glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993; 25:243-249.
- 164 - Ramsay J, Ward R, Bleehen NM. Radiosensitivity testing of human malignant gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1992; 24:675-680.
- 165 - Brock WA, Baker FL, Wike JL, Sivon SL, Peters LJ. Cellular radiosensitivity of primary head and neck squamous cell carcinomas and local tumor control. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1990; 18:1283-1286.

- 166 - Bese NS, Hendry J, Jeremic B. Effects of prolongation of overall treatment time due to unplanned interruptions during radiotherapy of different tumor sites and practical methods for compensation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007; 68:654-61.
- 167 - Hall EJ. Cell,tissue and tumor kinetics. En: Hall EJ editor. *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1994; pags. 191-210.
- 168 - Steel GG. Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours. *Eur J Cancer*. 1967; 3:381-387.
- 169 - Steel GG. Cell proliferation in tumors. En: Steel GG, Adams GE, Horwich A, eds. *The biological basis of radiotherapy*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1989; pags. 77-88.
- 170 - Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC, and Kärcher H. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry*, 1985; 6:620-626.
- 171 - Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
- 172 - Jorissen RN, Walker F, Pouliot N. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003 10; 284:31-53.
- 173 - Kim GE, Kim YB, Cho NH, et al. Synchronous coexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in carcinomas of the uterine cervix: a potential predictor of poor survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1366-74.
- 174 - Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 577–586.
- 175 - Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, et al. Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 1996; 78:433–440.
- 176 - Cho NH, Kim YB, Park TK et al. p63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 2003; 91:346–353.
- 177 - Lee CM, Lee RJ, Hammond E, et al. Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol Oncol* 2004; 93:209–214.

- 178 - Vosmik M, Laco J, Sirak I, et al. Prognostic significance of human papillomavirus (HPV) status and expression of selected markers (HER2/neu, EGFR, VEGF, CD34, p63, p53 and Ki67/MIB-1) on outcome after (chemo-) radiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Pathol Oncol Res.* 2014; 20:131-7.
- 179 - Lindström AK, Stendahl U, Tot T, et al. Predicting the outcome of squamous cell carcinoma of the uterine cervix using combinations of individual tumor marker expressions. *Anticancer Res* 2007; 27:1609-15.
- 180 - Yamashita H1, Murakami N, Asari T, et al. Correlation among six biologic factors (p53, p21(WAF1), MIB-1, EGFR, HER2, and Bcl-2) and clinical outcomes after curative chemoradiation therapy in squamous cell cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74:1165-72.
- 181 - Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2000; 206:624–35.
- 182 - Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-22.
- 183 - Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, et al. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol.* 2001;193:48-54.
- 184 - al-Saleh W1, Delvenne P, Greimers R, et al. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Correlation with the histologic grade and human papillomavirus type. *Am J Clin Pathol* 1995; 104:154-60.
- 185 - Oka K, Suzuki Y, Nakano T. High growth fraction at 9 grays of radiotherapy is associated with a good prognosis for patients with cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89:1526-31.
- 186 - Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, et al. MIB 1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer cell activity. *Gynecol Onco* 1995; 58:28-33.
- 187 - Suzuki M, Tsukagoshi S, Saga Y, et al. Assessment of proliferation index with MIB-1 as a prognostic factor in radiation therapy for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 79:300-4.
- 188 - Nakano T, Oka K. Differential values of Ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population. An assessment of cell cycle and prognosis in radiation therapy for cervical cancer. *Cancer* 1993; 72:2401-8.

- 189 - Sultana H, Kigawa J, Kanamori Y, et al. Chemosensitivity and p53-Bax pathway-mediated apoptosis in patients with uterine cervical cancer. *Ann Oncol*. 2003; 14:214-9.
- 190 - Oka K, Arai T. MIB1 growth fraction is not related to prognosis in cervical squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Int J Gynecol Pathol* 1996; 15:23-7.
- 191 - Pan D, Wei K1, Ling Y, Su S, Zhu M, Chen G. The prognostic role of Ki-67/MIB-1 in cervical cancer: a systematic review with meta-analysis. *Med Sci Monit*. 2015; 21:882-9.
- 192 - El-Deiry WAS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF/CIP1 in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54:1169-74.
- 193 - Wang JL, Zheng BY, Li XD, et al. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:2407-14.
- 194 - Hanprasertpong J, Tungsinmunkong K, Chichareon S, et al. Correlation of p53 and Ki-67 (MIB-1) expressions with clinicopathological features and prognosis of early stage cervical squamous cell carcinomas. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010 ;36:572-80.
- 195 - Jain D, Srinivasan R, Patel FD, et al. Evaluation of p53 and Bcl-2 expression as prognostic markers in invasive cervical carcinoma stage IIb/III patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol*. 2003; 88(1):22-8.
- 196 - Mega Tiber P, Baloglu L, Ozden S, et al. The association of apoptotic protein expressions sensitive to apoptosis gene, p73 and p53 with the prognosis of cervical carcinoma. *OncoTargets and therapy*. 2014; 7:2161-2168.
- 197 - Zhou R, Wei C, Liu J, et al. The prognostic value of p53 expression for patients with cervical cancer: a meta analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015; 195:210-3.
- 198 - Wootipooma W, Lekhyanandaa N, Phungrassamib T, et al. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol*. 2004; 94:636-642.
- 199 - Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:145-182.
- 200 - Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; 89:2637-2645.
- 201 - Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999;18:7908-7916.

- 202 - Gaffney DK1, Holden J, Zempolich K, et al. Elevated COX-2 expression in cervical carcinoma: reduced cause-specific survival and pelvic control. *Am J Clin Oncol*. 2001; 24:443-6.
- 203 - Kim YB, Kim GE, Cho NH, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 2002; 95:531-9.
- 204 - Lee JS, Choi YD, Lee JH, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and tumor growth. *Gynecol Oncol* 2004; 95:523-9.
- 205 - Gaffney DK, Holden J, Davis M, et al. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49:1213-7.
- 206 - Ishikawa H1, Ohno T, Kato S, et al. Cyclooxygenase-2 impairs treatment effects of radiotherapy for cervical cancer by inhibition of radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66:1347-55.
- 207 - Kim HJ, Wu HG, Park IA, et al. High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55:16-20.
- 208 - Huang M, Chen Q, Xiao J, Liu C, Zhao X. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2013;132:363-73.
- 209 - Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274:1672–1677.
- 210 - Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001; 264:42–55.
- 211 - Grønhøj Larsen C, Gyldenløve M, Jensen DH. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer* 2014; 10:1587-94.
- 212 - Tringler B, Gup CJ, Singh M, et al. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol*. 2004; 35:689-96.
- 213 - Lu X, Toki T, Konishi I, et al. Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer*. 1998; 82:2409-17.

- 214 - Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, et al. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:187-93.
- 215 - Ansari-Lari MA, Staebler A, Zaino RJ, et al. Distinction of endocervical and endometrial adenocarcinomas: immunohistochemical p16 expression correlated with human papillomavirus (HPV) DNA detection. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28:160-7.
- 216 - Koo CL, Kok LF, Lee MY, et al. Scoring mechanisms of p16INK4a immunohistochemistry based on either independent nucleic stain or mixed cytoplasmic with nucleic expression can significantly signal to distinguish between endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. *J Transl Med*. 2009; 7:25.
- 217 - Masoudi H, Van Niekerk DJ, Gilks DB, et al. Loss of p16 INK4 expression in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix is an adverse prognostic marker. *Histopathology*. 2006; 49: 542–545.
- 218 - van de Putte G, Holm R, Lie AK, et al. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol*. 2003; 89:140-7.
- 219 - Schwarz JK, Lewis JS Jr, Pfeifer J, et al. Prognostic significance of p16 expression in advanced cervical cancer treated with definitive radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 84:153-7.
- 220 - Lin J, Albers AE, Qin J, et al. Prognostic significance of overexpressed p16INK4a in patients with cervical cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9:e106384.
- 221 - Denekamp J. Physiological hypoxia and its influence on radiotherapy. En: Steel GG, Adams GE, Horwich A, eds. *The biological basis of radiotherapy*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1989; pags. 115-134.
- 222 - Kolstad P. Vascularization, oxygen tension and local recurrence in cervix cancer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 1968; 106:145-157.
- 223 - Siracka E, Siracky J, Pappova N, et al. Vascularization and radiocurability in cancer of the cervix. *Neoplasma* 1982; 29:183-188.
- 224 - Brady LW, Plenk HP, Hanley JA, et al. Hyperbaric oxygen therapy for carcinoma of the cervix- Stages IIB,IIIA,IIIB and IVA: Results of a randomized study by the Radiation Therapy Oncology Group. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 1981; 7:991-998.

- 225 - Stehman FB, Bundy BN, Thomas G, et al. Hydroxyurea versus misonidazole with radiation in cervical carcinoma: long-term follow-up of a Gynecologic Oncology Group trial. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11:1523-1528.
- 226 - Komarnicky LT, Phillips TL, Martz K, et al. A randomized phase II protocol for the evaluation of misonidazole combined with radiation in the treatment of patients with brain metastases (RTOG-7916). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1991; 20:53-58.
- 227 - Stone HB, Brown JM, Phillips TL, et al. Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. *Cancer Res.* 1993; 136:422-434.
- 228 - Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum SS, et al. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relation to outcome of radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1988; 14:539-549.
- 229 - Okunieff P, Hoeckel M, Dunphy EP, et al. Oxygen distributions are sufficient to explain the local response of human breast tumors treated with radiation alone. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993; 26:631-636.
- 230 - Hockel M, Knoop C, Schlenger K, et al. Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother. Oncol.* 1993; 26:45-50.
- 231 - Koh WJ, Bergman KS, Rasey JS, et al. Evaluation of oxygenation status during fractionated radiotherapy in human nonsmall cell lung cancers using [F-18]fluoromisonidazole positron emission tomography. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995; 33:391-398.
- 232 - Fyles AW, Milosevic M, Wong R, et al. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol.* 1998; 48:149-56.
- 233 - Hockel M, Schlenger K, Aral B, et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996; 56:4509-15.
- 234 - Höckel M, Schlenger K, Höckel S, et al. Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. *Int J Cancer.* 1998; 79:365-9.
- 235 - Vercellino L, Groheux D, Thoury A, et al. Hypoxia imaging of uterine cervix carcinoma with (18)F-FETNIM PET/CT. *Clin Nucl Med.* 2012; 37:1065-8.
- 236 - Dehdashti F, Grigsby PW, Lewis JS, et al. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by PET with <sup>60</sup>Cu-labeled diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone). *J Nucl Med.* 2008; 49:201-5.



- 237 - Toi M, Kondo S, Suzuki H, et al. (1996) Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer*. 1996; 77:1101 – 1106.
- 238 - Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*. 1995; 55: 3964 – 3968.
- 239 - Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87:1237-45.
- 240 - Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, et al. The angiogenic 'vascular endothelial growth factor/flk-1/KDR receptor' pathway in patients with endometrial carcinoma: Prognostic and therapeutic implications. *Cancer*. 2001; 92: 2569 – 2577.
- 241 - Van Dijke CF, Brasch RC, Roberts TP, et al. Mammary carcinoma model: correlation of macromolecular contrast-enhanced MR imaging, characterisations of tumour microvasculature and histologic capillary density. *Radiology*. 1996; 198: 813 – 818.
- 242 - Cooper RA, Carrington BM, Loncaster JA, et al. Tumour oxygenation levels correlate with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging parameters in carcinoma of the cervix. *Radiother Oncol*. 2000; 57:53-9.
- 243 - Schor AM, Pendleton N, Pazouki S, et al. Assessment of vascularity in histological sections: effects of methodology and value as an index of angiogenesis on breast tumours. *Histochem J*. 1998; 30: 849 – 856.
- 244 - Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2474-2484.
- 245 - Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. Breast carcinoma: comparative study of tumour vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86: 386 – 388.
- 246 - Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: Comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 3410 – 3415.
- 247 - Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer*. 2002; 86:1566-77.

- 248 - Ueda M, Terai Y, Kumagai K. Correlation between tumor angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase, and patient outcome in uterine cervical carcinoma. *Hum Pathol*. 1999; 30:1389-94.
- 249 - Hawighorst H, Knapstein PG, Knopp MV, et al. Uterine cervical carcinoma: comparison of standard and pharmacokinetic analysis of time-intensity curves for assessment of tumor angiogenesis and patient survival. *Cancer Res*. 1998; 58:3598-602.
- 250 - Hale RJ, Buckley CH, Gullick WJ et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46: 149–153.
- 251 - Lee CM, Shrieve DC, Zempolich KA, et al. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2005; 99:415-21.
- 252 - Rojas-Puentes L, Cardona AF, Carranza H, et al. Epithelial-mesenchymal transition, proliferation, and angiogenesis in locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy. *Cancer Med*. 2016; 5:1989-99.
- 253 - Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in locally advanced cervical cancer patients undergoing chemoradiation plus surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55:21-7.
- 254 - Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190:668-73.
- 255 - Kaplan EL and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assoc*. 1958; 53:457–81.
- 256 - Cox DR. Regression Models and Life Tables. *J R Stat Soc*. 1972; 34:187—220.
- 257 - Viswanathan, A.N. Uterine cervix. En: Perez CA, Brady LW editores. *Principles and Practice of Radiation Oncology*. Sexta edición. Philadelphia: Lippincot and Wilkins; 2013. p. 4633-4883.
- 258 - Horiot JC, Pigneux J, Pourquier H, et al. Radiotherapy alone in carcinoma of the intact uterine cervix according to G. H. Fletcher guidelines: a French cooperative study of 1383 cases. ); *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1988; 14:605-11.
- 259 - Barillot I, Horiot JC, Pigneux J, et al. Carcinoma of the intact uterine cervix treated with radiotherapy alone: a French cooperative study: update and multivariate analysis of prognostics factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997; 38:969-78.

- 260 - Delgado G, Bundy B, Zaino R, et al. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1990; 38:352–357.
- 261 - Katanyoo K, Sanguanrungrasirikul S, Manusirivithaya S. Comparison of treatment outcomes between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2012; 125:292-6.
- 262 - Sedlis A, Bundy BN, Rotman MZ, Lentz SS, Muderspach LI, Zaino RJ. A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage 1b carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 1999; 73:177–83.
- 263 - Rotman M, Sedlis A, Piedmonte MR, Bundy B, Lentz SS, Muderspach LI, et al. A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in stage 1B cervical carcinoma with poor prognostic features: follow-up of a Gynecologic Oncology Group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006; 65:169–76.
- 264 - Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2000; 18:1606–13.
- 265 - Roszak A, Wareńczak-Florczak Z, Bratos K, et al. Incidence of radiation toxicity in cervical cancer and endometrial cancer patients treated with radiotherapy alone versus adjuvant radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2012; 17:332-8.
- 266 - Gandhi AK, Sharma DN, Rath GK, et al. Early clinical outcomes and toxicity of intensity modulated versus conventional pelvic radiation therapy for locally advanced cervix carcinoma: a prospective randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013; 87:542-8.
- 267 - Mazon JJ, Simon JM, Le Pêcheux C, et al. Effect of dose rate on local control and complications in definitive irradiation of T1-2 squamous cell carcinomas of mobile tongue and floor of mouth with interstitial iridium-192. *Radiother Oncol*. 1991; 21:39-47.
- 268 - Haie-Meder C, Kramar A, Lambin P, et al. Analysis of complications in a prospective randomized trial comparing two brachytherapy low dose rates in cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 953–960.

- 269 - Perez CA, Grigsby PW, Camel HM, et al. Irradiation alone or combined with surgery in stage IB, IIA and IIB carcinoma of uterine cervix; update of a nonrandomized comparison. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 703–716.
- 270 - Romero J, de la Torre A, Vargas JA, et al. Determinación de la fracción superviviente a 2 gy (FS2) y el tiempo potencial de doblamiento (Tpot) en pacientes sometidos a radioterapia radical: resultados preliminares de un estudio prospectivo. *Oncología* 1996; 19:584-592.
- 271 - Begg AC, Hofland I, Van Glabekke M, Bartelink H, Horiot JC. Predictive value of potential doubling time for radiotherapy of head and neck tumor patients: results from the EORTC cooperative trial 22851. *Sem. Radiat. Oncol.* 1992; 2:22-25.
- 272 - Bourhis J, Wilson G, Wibault P, Bosq J, Chavaudra N, Janot F, Luboinski B, Eschwege F, Malaise EP. In vivo measurements of the potential doubling time by flow cytometry in oropharyngeal cancer treated by conventional radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993; 26:793-799.
- 273 - Tsang RW, Fyles AW, Kirkbride P, et al. Proliferation measurements with flow cytometry Tpot in cancer of the uterine cervix: correlation between two laboratories and preliminary clinical results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 32:1319-29.
- 274 - Begg AC, Haustermans K, Hart AA et al. The value of pretreatment cell kinetic parameters as predictors for radiotherapy outcome in head and neck cancer: a multicenter analysis. *Radiother Oncol.* 1999; 50(1):13-23.
- 275 - Cole DJ, Brown DC, Crossley E, Alcock CJ, and Gatter KC. Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of the relationship of tumour proliferation to prognosis. *Br J Cancer.* 1992; 65: 783–785.
- 276 - Giordano G, D'Adda T, Dal Bello B, et al. Clinicopathologic implications of the epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase 2 expression, and human papillomavirus status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the elderly. *Int J Gynecol Cancer.* 2011; 21:337-48.
- 276 - Giordano G, D'Adda T, Dal Bello B, et al. Clinicopathologic implications of the epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase 2 expression, and human papillomavirus status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the elderly. *Int J Gynecol Cancer.* 2011; 21:337-48.
- 277 - Alfsen GC, Reed W, Sandstad B, Kristensen GB, Abeler VM. The prognostic impact of cyclin dependent kinase inhibitors p21WAF1, p27Kip1, and p16INK4/MTS1 in adenocarcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical evaluation of

expression patterns in population-based material from 142 patients with international federation of gynecology and obstetrics stage I and II adenocarcinoma. *Cancer*. 2003; 98:1880-9.

278 - Bodner K, Laubichler P, Kimberger O, Czerwenka K, Zeillinger R, Bodner-Adler B. Expression of p16 protein and epidermal growth factor receptor in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: an immunohistochemical analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2011; 283:611-6.

279 - Cooper RA, Wilks DP, Logue JP, et al. High tumour angiogenesis is associated with poorer survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 1998; 4:2795 – 2800